

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología

Área de Nutrición y Bromatología



**DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE HIDROCARBUROS
AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (BENZO[a]PIRENO) EN:**

I. ALIMENTOS AHUMADOS

II. ADITIVOS PARA AHUMADO (AROMAS DE HUMO)

MERCEDES SONIA GARCÍA FALCÓN

1996

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología

Área de Nutrición y Bromatología

DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE HIDROCARBUROS
AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (BENZO[a]PIRENO) EN:

I. ALIMENTOS AHUMADOS

II. ADITIVOS PARA AHUMADO (AROMAS DE HUMO)

MERCEDES SONIA GARCÍA FALCÓN

1996

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología

Área de Nutrición y Bromatología

DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE HIDROCARBUROS
AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (BENZO[*a*]PIRENO) EN:
I. ALIMENTOS AHUMADOS
II. ADITIVOS PARA AHUMADO (AROMAS DE HUMO)

Memoria presentada por Mercedes Sonia García Falcón en la Universidad
de Santiago de Compostela para optar al Grado de Doctor

Santiago de Compostela, Diciembre de 1996

RAFAEL CELA TORRIJOS, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA, NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

AUTORIZA a Dña. Mercedes Sonia García Falcón a presentar el trabajo titulado "*DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (BENZO[a]PIRENO) EN: I. ALIMENTOS AHUMADOS, II. ADITIVOS PARA AHUMADO (AROMAS DE HUMO)*" realizado bajo la dirección de los Dres. D. Jesús Simal Lozano y Dña. M^a Asunción Lage Yusty, en los Laboratorios de Bromatología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, se expide la presente en Santiago de Compostela, en Diciembre de mil novecientos noventa y seis.



Fdo. Dr. D. Rafael Cela Torrijos

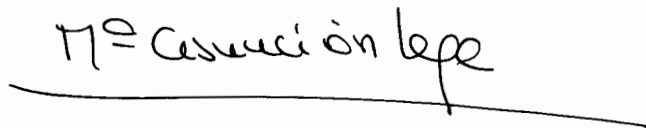
JESÚS SIMAL LOZANO Y M^a ASUNCIÓN LAGE YUSTY, CATEDRÁTICOS DEL
ÁREA DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA DE LA FACULTAD DE FARMACIA
DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

HACEN CONSTAR que la Tesis titulada "*DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (BENZO[a]PIRENO) EN: I. ALIMENTOS AHUMADOS, II. ADITIVOS PARA AHUMADO (AROMAS DE HUMO)*" presentada por la Licenciada en Farmacia Dña. Mercedes Sonia García Falcón, para optar al Grado de Doctor en Farmacia, ha sido realizada bajo nuestra dirección en los Laboratorios de Bromatología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, se expide la presente en Santiago de Compostela, en Diciembre de mil novecientos noventa y seis.



Fdo: Prof. Dr. J. Simal Lozano



Fdo: Prof. Dra. M.A. Lage Yusty

Deseo expresar mi agradecimiento:

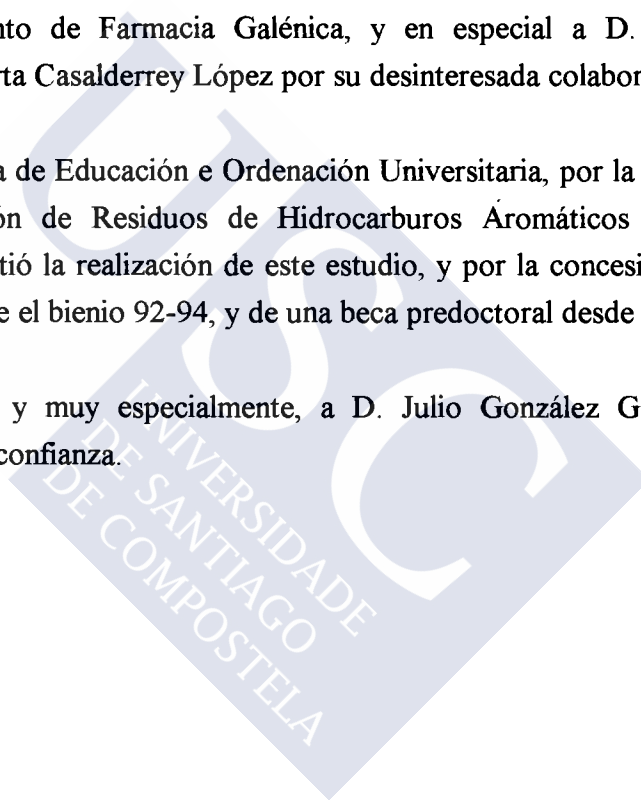
A los directores de este trabajo, Dra. Dña. María Asunción Lage Yusty y Dr. D. Jesús Simal Lozano, por la orientación y el apoyo prestados para la realización del mismo.

A todos los profesores y compañeros de este Departamento, especialmente a Dña. Susana González Amigo y a la Dra. Dña. Susana Carril González - Barros, por su dedicación y constante ayuda.

Al Departamento de Farmacia Galénica, y en especial a D. Álvaro Ganza González y a Dña. Marta Casalderrey López por su desinteresada colaboración.

A la Consellería de Educación e Ordenación Universitaria, por la financiación del proyecto "Investigación de Residuos de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en Alimentos", que permitió la realización de este estudio, y por la concesión de una beca de Tercer Ciclo durante el bienio 92-94, y de una beca predoctoral desde 1995.

Y por último, y muy especialmente, a D. Julio González González por su incondicional apoyo y confianza.





A mi Familia

ÍNDICES



ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE TABLAS	XI
ABREVIATURAS	XIV
INTRODUCCIÓN	1
1. EL BENZO(A)PIRENO Y LOS HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS	2
1.1 ESTRUCTURA	3
1.2. PROPIEDADES QUÍMICAS	3
1.3. ETIOLOGÍA DE LOS HAP	7
1.3.1. FUENTES NATURALES	7
1.3.2. FUENTES ANTROPOGÉNICAS	7
1.4. PRESENCIA DE LOS HAP EN LOS ALIMENTOS	8
1.4.1. POLUCIÓN EN ORIGEN	8
1.4.2. POLUCIÓN CAUSADA POR MANIPULACIÓN Y TRATAMIENTO	9
1.5. TOXICOLOGÍA	22
1.5.1. REVISIÓN HISTÓRICA	22
1.5.2. RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD Y METABOLISMO	24
1.5.3. SIGNIFICACIÓN TOXICOLÓGICA PARA EL HOMBRE	25
1.5.4. EXPOSICIÓN HUMANA A LOS HAP	27
1.6 LEGISLACIÓN	29

1.7. FICHA TÉCNICA DEL BENZO(A)PIRENO	31
ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS	34
1. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN	37
1.1. ALIMENTOS	37
1.2. AROMAS DE HUMO	43
2. MÉTODOS DE MEDIDA	46
OBJETIVOS	50
PARTE EXPERIMENTAL	52
1. MATERIAL Y APARATOS	53
2. PROGRAMAS DE ORDENADOR	53
3. REACTIVOS	54
4. PREPARACIÓN DE LOS PATRONES	55
DETERMINACIÓN DE BENZO(A)PIRENO EN ALIMENTOS AHUMADOS MEDIANTE HPLC-FL	56
1. PROTOCOLO ANALÍTICO	57
1.1. DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS	57
1.2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	57
1.3. PROCEDIMIENTO	57
1.3.1. EXTRACCIÓN	57
1.3.2. PURIFICACIÓN	57
1.3.3. ANÁLISIS	61
1.3.3.1. ESPECTROFLUORIMETRÍA	61

1.3.3.2. HPLC-FL	62
1.3.4. CONFIRMACIÓN DE RESULTADOS	62
2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	62
2.1. EXTRACCIÓN	62
2.2 PURIFICACIÓN	65
2.2.1. PURIFICACIÓN MEDIANTE SEP PAK DE SÍLICA PLUS	66
2.2.2. EXTRACCIÓN DEL N-HEXANO CON DIMETILSULFÓXIDO	67
2.2.3. PURIFICACIÓN MEDIANTE SEP PAK C18 PLUS	68
2.3. ANÁLISIS	71
2.3.1. ESPECTROFLUORIMETRÍA	71
2.3.2. HPLC-FL	73
2.4. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN	75
2.5. CUANTIFICACIÓN Y LINEARIDAD DE LA RESPUESTA DEL DETECTOR	79
2.6. CONFIRMACIÓN DE RESULTADOS	79
2.7. PRECISIÓN	83
2.8. RECUPERACIÓN	83
2.9. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS	86
DETERMINACIÓN DE BENZO(A)PIRENO EN AROMAS DE HUMO LÍQUIDO LIPOSOLUBLE MEDIANTE HPLC-FL	99
1. PROTOCOLO ANALÍTICO	100
1.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA	100
1.2. PROCEDIMIENTO	100
1.2.1. EXTRACCIÓN	100

1.2.2. PURIFICACIÓN	100
1.2.3. ANÁLISIS Y COFIRMACIÓN DE RESULTADOS	100
2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	101
2.1. EXTRACCIÓN	101
2.2. PURIFICACIÓN	101
2.3. ANÁLISIS Y CONFIRMACIÓN	102
2.4. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN	102
2.5. CUANTIFICACIÓN Y LINEARIDAD DE LA RESPUESTA	102
2.6. PRECISIÓN Y RECUPERACIÓN	102
EFFECTOS DEL SOLVENTE Y DEL OXIGENO DISUELTO EN LA DETERMINACION DE BENZO(A)PIRENO MEDIANTE ESPECTROFLUORIMETRÍA SINCRÓNICA	106
1. PROTOCOLO ANALÍTICO	107
1.1. EFECTO DEL SOLVENTE	107
1.2. EFECTO DEL OXÍGENO DISUELTO	107
1.3. ESTUDIO DE LA FOTODEGRADACIÓN DEL B(A)P EN SOLUCIÓN	108
2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	108
2.1. EFECTO DEL SOLVENTE	108
2.2. EFECTO DEL OXÍGENO DISUELTO	123
2.3. DEGRADACIÓN DEL B(A)P	126
DETERMINACIÓN DE BENZO(A)PIRENO EN AROMAS DE HUMO HIDROSOLUBLES MEDIANTE ESPECTROFLUORIMETRÍA SINCRÓNICA	131
1. PROTOCOLO ANALÍTICO	132
1.1. DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS	132

1.2. PROCEDIMIENTO	134
1.2.1. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN	134
1.2.2. ANÁLISIS Y CONFIRMACIÓN DE RESULTADOS	135
2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	136
2.1. PURIFICACIÓN	136
2.2. ANÁLISIS Y CONFIRMACIÓN DE RESULTADOS	137
2.3. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN	141
2.4. CUANTIFICACIÓN Y LINEARIDAD DE LA RESPUESTA DEL DETECTOR	141
2.5. PRECISIÓN Y RECUPERACIÓN	143
2.6. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS	143
CONCLUSIONES	145
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	148



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.-	Espectros de emisión y excitación del benzo(a)pireno en n-hexano	5
Figura 2.-	Espectro de UV del benzo(a)pireno en n-hexano	6
Figura 3.-	Espectro de masas del benzo(a)pireno	6
Figura 4.-	Formación del benzo(a)pireno a partir de productos de descomposición de la celulosa, hemicelulosa y lignina.	15
Figura 5.-	Formación de hidrocarburos aromáticos policíclicos a partir del naftaleno	15
Figura 6.-	Generador de humo convencional acoplado a un ahumadero tradicional	17
Figura 7.-	Esquema de la preparación de aromas de humo	20
Figura 8.-	Esquema del método propuesto por Grimmer y Bonke (1975) para el análisis de PAH en alimentos	38
Figura 9.-	Esquema del método propuesto por Pfannhauser (1991 a) para el análisis de PAH en alimentos	39
Figura 10.-	Esquema del método utilizado para el análisis de benzo(a)pireno en alimentos ahumados	60
Figura 11.-	Envases de papel de filtro utilizados para la extracción de las muestras de alimentos	64
Figura 12.-	Optimización del volumen de n-hexano necesario para la elución del benzo(a)pireno retenido en la minicolumna Sep-pack sílica Plus.	67
Figura 13.-	Optimización de la proporción de DMSO:agua para la retención del benzo(a)pireno en la minicolumna Sep-pack C-18 Plus	69

Figura 14.-	Sistema de vacío utilizado para pasar la mezcla DMSO:agua a través de la minicolumna Sep-pack C-18 Plus	70
Figura 15.-	Optimización del volumen de n-hexano necesario para la elución del benzo(a)pireno retenido en la minicolumna Sep-pack C-18 Plus	71
Figura 16.-	Espectro de fluorescencia sincrónico de benzo(a)pireno en n-hexano ($\Delta\lambda = 110$ nm) y su segunda derivada	72
Figura 17.-	Recta de calibrado del benzo(a)pireno en n-hexano obtenida por espectrofluorimetría sincrónica con aplicación de segunda derivada ($\Delta\lambda$ 110 nm, rango 1-16 $\mu\text{g/L}$)	74
Figura 18.-	Sistema de mantenimiento de la temperatura de la columna en HPLC	76
Figura 19.-	Anchuras características del pico cromatográfico del benzo(a)pireno	77
Figura 20.-	Recta de calibrado del benzo(a)pireno en ACN obtenida mediante HPLC-FL con $\lambda_{\text{exc.}} = 296$ nm, $\lambda_{\text{em.}} = 406$ nm (rango 0.25-16 $\mu\text{g/L}$)	80
Figura 21.-	Cromatogramas de benzo(a)pireno en ACN (0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 $\mu\text{g/L}$) obtenidos mediante HPLC-FL ($\lambda_{\text{exc.}} = 296$ nm, $\lambda_{\text{em.}} = 406$ nm)	82
Figura 22.-	Cromatogramas de benzo(a)pireno en ACN (0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 $\mu\text{g/L}$) obtenidos mediante HPLC-FL ($\lambda_{\text{exc.}} = 296$ nm, $\lambda_{\text{em.}} = 426$ nm)	82
Figura 23.-	Espectros de emisión de benzo(a)pireno en ACN (1, 2, 4, 8 y 16 $\mu\text{g/L}$) realizados mediante HPLC-FL	84
Figura 24.-	Espectros sincrónicos de benzo(a)pireno en ACN (2, 4, 8 y 16 $\mu\text{g/L}$) realizados mediante HPLC-FL	84

Figura 25.-	Cromatogramas de 0.5 µg/L de benzo(a)pireno en ACN ($\lambda_{exc.} = 296$ nm, $\lambda_{em.} = 426$ nm (verde oscuro)) ($\lambda_{exc.} = 296$ nm, $\lambda_{em.} = 406$ nm (verde claro)); y de la muestra nº 9 ($\lambda_{exc.} = 296$ nm, $\lambda_{em.} = 426$ nm (azul claro)) ($\lambda_{exc.} = 296$ nm, $\lambda_{em.} = 406$ nm (azul oscuro))	87
Figura 26.-	Cromatograma de la muestra nº 20 ($\lambda_{exc.} = 296$ nm, $\lambda_{em.} = 406$ nm)	88
Figura 27.-	Cromatograma de la muestra nº 24 ($\lambda_{exc.} = 296$ nm, $\lambda_{em.} = 406$ nm)	90
Figura 28.-	Cromatograma de la muestra nº 48 ($\lambda_{exc.} = 296$ nm, $\lambda_{em.} = 406$ nm)	91
Figura 29.-	Espectros sincrónicos de 2 µg/L de benzo(a)pireno en ACN (verde) y de la muestra nº 20 (azul), realizados mediante HPLC-FL	93
Figura 30.-	Espectros de emisión y sincrónicos de 8 µg/L de benzo(a)pireno en ACN (verde) y de la muestra nº 24 (azul), realizados mediante HPLC-FL	94
Figura 31.-	Espectros de emisión y sincrónicos de 16 µg/L de benzo(a)pireno en ACN (verde) y de la muestra nº 48 (azul), realizados mediante HPLC-FL	95
Figura 32.-	Cromatogramas de 10 µg/L de benzo(a)pireno en ACN (verde), de la muestra de humo líquido liposoluble (azul) y de la misma muestra sobrecargada con 5 µg/kg de benzo(a)pireno ($\lambda_{exc.} = 296$ nm, $\lambda_{em.} = 406$ nm)	103
Figura 33.-	Espectros de emisión y sincrónicos de 3 µg/L de benzo(a)pireno en ACN y de la muestra de humo líquido liposoluble, realizados mediante HPLC-FL	104
Figura 34.-	Diagrama tridimensional y mapa de contorno del DMSO	109
Figura 35.-	Diagrama tridimensional y mapa de contorno del ACN	110
Figura 36.-	Diagrama tridimensional y mapa de contorno del n-hexano	111

Figura 37.-	Diagrama tridimensional y mapa de contorno de benzo(a)pireno en DMSO	114
Figura 38.-	Diagrama tridimensional y mapa de contorno de benzo(a)pireno en ACN	115
Figura 39.-	Diagrama tridimensional y mapa de contorno de benzo(a)pireno en n-hexano	116
Figura 40.-	Espectros de fluorescencia sincrónicos de 8 µg/L de benzo(a)pireno en DMSO ($\Delta\lambda = 20$ nm) (verde), acetona ($\Delta\lambda = 20$ nm) (azul) y metanol ($\Delta\lambda = 25$ nm) (amarillo), antes (A) y después (B) del borboteo con nitrógeno	117
Figura 41.-	Espectros de fluorescencia sincrónicos de 8 µg/L de benzo(a)pireno en DMSO (verde), acetona (azul) y metanol (amarillo), antes (A) y después (B) del borboteo con nitrógeno ($\Delta\lambda = 110$ nm)	118
Figura 42.-	Espectros de fluorescencia sincrónicos de 8 µg/L de benzo(a)pireno en ACN (verde), benceno (azul) y diclorometano (amarillo), antes (A) y después (B) del borboteo con nitrógeno ($\Delta\lambda = 20$ nm)	119
Figura 43.-	Espectros de fluorescencia sincrónicos de 8 µg/L de benzo(a)pireno en ACN (verde), benceno (azul) y diclorometano (amarillo), antes (A) y después (B) del borboteo con nitrógeno ($\Delta\lambda = 110$ nm)	120
Figura 44.-	Espectros de fluorescencia sincrónicos de 8 µg/L de benzo(a)pireno en cloroformo (verde), tolueno (azul) y n-hexano (amarillo), antes (A) y después (B) del borboteo con nitrógeno ($\Delta\lambda = 20$ nm)	121
Figura 45.-	Espectros de fluorescencia sincrónicos de 8 µg/L de benzo(a)pireno en cloroformo ($\Delta\lambda = 110$ nm) (verde), tolueno ($\Delta\lambda = 100$ nm) (azul) y n-hexano ($\Delta\lambda = 110$ nm) (amarillo), antes (A) y después (B) del borboteo con nitrógeno	122
Figura 46.-	Variación de la fluorescencia del benzo(a)pireno frente al tiempo en n-hexano, ACN y benceno	128

Figura 47.-	Variación de la fluorescencia del benzo(a)pireno frente al tiempo en tolueno, metanol y DMSO	129
Figura 48.-	Variación de la fluorescencia del benzo(a)pireno frente al tiempo en acetona, cloroformo y diclorometano	130
Figura 49.-	Optimización de la proporción de ACN:agua para la retención del benzo(a)pireno en la minicolumna Sep-pack C-18 Plus	137
Figura 50.-	<p>A: Espectros de fluorescencia sincrónica de la muestra nº 7 en n-hexano antes (verde) y después (azul) del borboteo con nitrógeno ($\Delta\lambda = 20$ nm)</p> <p>B: Espectros de fluorescencia sincrónica de la muestra nº 7 en n-hexano antes (verde) y después (azul) del borboteo con nitrógeno ($\Delta\lambda = 110$ nm)</p>	138
Figura 51.-	Espectros de fluorescencia sincrónica de 4 µg/L de benzo(a)pireno (verde), de la muestra nº 2 (azul), de la muestra nº 3 (amarillo) y de la muestra nº 7 (rojo) en n-hexano, antes (A) y después (B) del borboteo con nitrógeno ($\Delta\lambda = 20$ nm)	139
Figura 52.-	Derivada de segundo orden de la zona marcada en la figura 51 (B)	140
Figura 53.-	Espectros de fluorescencia sincrónica de la muestra nº 5 en n-hexano antes (verde) y después (azul) del borboteo con nitrógeno y en DMSO antes (amarillo) y después (rojo) del borboteo con nitrógeno ($\Delta\lambda = 20$ nm)	142

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.-	Estructura de algunos PAH identificados en los alimentos y su actividad cancerígena	4
Tabla II.-	Niveles de PAH (μg) encontrados en bistec a la parrilla	11
Tabla III.-	Formación de benzo(a)pireno al freir un alimento en aceite de palma (200 - 225°C) durante diferentes periodos de tiempo	12
Tabla IV.-	Efecto de los diferentes modos de cocinado en la formación de benzo(a)pireno	12
Tabla V.-	Niveles de PAH en diferentes productos ahumados ($\mu\text{g/Kg.}$)	16
Tabla VI.-	Características de las muestras de alimentos analizadas	58
Tabla VII.-	RSD y % R obtenidos en la elución con n-hexano de diferentes cantidades de benzo(a)pireno retenidas en la minicolumna Sep-pack sílica Plus al repetir cada ensayo por sextuplicado	67
Tabla VIII.-	RSD y % R obtenidos en el estudio de la extracción de diferentes cantidades de benzo(a)pireno en n-hexano con dimetilsulfóxido al repetir cada ensayo por sextuplicado	68
Tabla IX.-	RSD y % R obtenidos en la elución con n-hexano de diferentes cantidades de benzo(a)pireno retenidas en la minicolumna Sep-pack C-18 Plus al repetir cada ensayo por sextuplicado	69
Tabla X.-	Límites de detección (LD) y cuantificación (LQ) del benzo(a)pireno en n-hexano obtenidos por espectrofluorimetría sincrónica ($\Delta\lambda$ 110 nm) con aplicación de segunda derivada	73
Tabla XI.-	Recta de calibrado del benzo(a)pireno en n-hexano obtenida por espectrofluorimetría sincrónica ($\Delta\lambda$ 110 nm) con aplicación de segunda derivada	73

Tabla XII.-	Optimización de la eficacia de la columna en función del flujo	75
Tabla XIII.-	Características del pico cromatográfico de benzo(a)pireno según la Farmacopea Europea (EP)	77
Tabla XIV.-	Características del pico cromatográfico de benzo(a)pireno según la Farmacopea Americana (USP)	77
Tabla XV.-	Límites de detección (LD) y cuantificación (LQ) del benzo(a)pireno en ACN obtenidos por HPLC-FL ($\lambda_{exc.} = 296$ y $\lambda_{em.} = 406$)	78
Tabla XVI.-	Límites de detección (LD) y cuantificación (LQ) del benzo(a)pireno en función del % Humedad (p/p) de las muestras	79
Tabla XVII.-	RSD del método obtenida para la muestra nº 9 (salchicha " <i>frankfurt</i> ")	83
Tabla XVIII.-	RSD y % R obtenidas al someter seis veces al procedimiento experimental descrito una muestra de salchicha sobrecargada con benzo(a)pireno	85
Tabla XIX.-	RSD y % R obtenidas al someter seis veces al procedimiento experimental descrito una muestra de palometa sobrecargada con benzo(a)pireno	85
Tabla XX.-	Contenido de benzo(a)pireno ($\mu\text{g/Kg}$) y porcentaje de humedad (% p/p) en las muestras de alimentos analizadas	96
Tabla XXI.-	RSD y % R obtenidas al someter seis veces al procedimiento experimental descrito una muestra de aroma de humo lipofílico sobrecargada con benzo(a)pireno	105
Tabla XXII.-	Espectros sincrónicos óptimos y longitudes de onda de excitación máxima, obtenidos para el benzo(a)pireno en los nueve solventes objeto de estudio	113

Tabla XXIII.-	Límites de detección y de cuantificación del benzo(a)pireno en los nueve solventes objeto de estudio, en cada uno de los espectros sincrónicos óptimos antes (LD ^a y LD ^a) y después (LD ^b y LQ ^b) del borboteo con nitrógeno	124
Tabla XXIV.-	Rectas de calibrado del benzo(a)pireno en los nueve solventes objeto de estudio correspondientes a cada uno de los espectros sincrónicos óptimos, antes (a) y después (b) del borboteo con nitrógeno	125
Tabla XXV.-	Pendientes y coeficientes de regresión (r) obtenidos al representar la variación de la intensidad de fluorescencia (UF) del benzo(a)pireno en los diferentes solventes, frente al tiempo	126
Tabla XXVI.-	Características de las muestras de aroma de humo hidrofílico nº 3, 5, 6 y 7.	133
Tabla XXVII.-	Recta de calibrado del benzo(a)pireno en n-hexano obtenida por espectrofluorimetría sincrónica ($\Delta\lambda$ 20 nm) con aplicación de segunda derivada, tras el borboteo con nitrógeno	141
Tabla XVIII.-	RSD y % R obtenidas al someter seis veces al procedimiento experimental descrito una muestra de aroma de humo hidrofílico (nº 8) sobrecargada con benzo(a)pireno	143
Tabla XXIX.-	Contenido de benzo(a)pireno ($\mu\text{g/Kg}$) en las muestras de aroma de humo hidrofílico analizadas	144

LISTA DE ABREVIATURAS

$\Delta\lambda$: Intervalo de longitud de onda
 λ : Longitud de onda
 $\lambda_{em.}$: Longitud de onda de emisión
 $\lambda_{exc.}$: Longitud de onda de excitación
 $\lambda_{max.}$: Longitud de onda máxima
% R: Recuperación por cien
[]: Concentración
ACN: Acetonitrilo
ADN: Ácido desoxirribonucleico
AHHL: Aroma de humo hidrofílico líquido
AHHS: Aroma de humo hidrofílico sólido
AHLL: Aroma de humo líquido lipofílico
ARN: Ácido ribonucleico
B(a)P: Benzo(a)pireno
CAT N°: Número en catálogo
col.: Colaboradores
CPU: Central processing unit
DL50: Dosis letal 50 %
DMSO: Dimetilsulfóxido
FID: Flame Ionization Detector
FL: Fluorescencia
FLDM: Fluorescence Data Manager
GC: Gas Chromatography
GPC: Gel Permeation Chromatography
HPLC: High Performance Liquid Chromatography
IDA: Ingesta diaria admisible
LC: Liquid Chromatography
LD: Límite de detección
LQ: Límite de cuantificación
m.h.: Materia húmeda
m.s.: Materia seca
MFS: Micro Filtration Systems
mín: Mínimo
MS: Mass Spectrometry
ND: No detectable
NM: No medible

P: Probabilidad
PAH: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
PC: Paper chromatography
PM: Peso molecular
psi: Pound square inches
r: Coeficiente de correlación
RAM: Random Access Memory
RSD: Relative standard desviation
SD: Standard desviation
SFE: Supercritical Fluids Extraction
SRM: Standard Reference Materials
SST: System Suitability Test
TLC: Thin Layer Chromatography
Tr: Tiempo de retención
UF: Unidades de fluorescencia
UV: Ultravioleta
Vis.: Visible
WOW: Winner on Windows
X: Media

(ORGANISMOS)

ACGIH: American Conference of Governmental Industrial Hygienist
ACS: American Chemical Society
AOAC: Association of Official Analytical Chemists
APHA: American Public Health Association
ASTM: American Society for Testing Materials
AWWA: American Water Association
BCR: Bureau de Communauté de Référence
CAS: Chemical Abstract Service
CEE: Comunidad Económica Europea
EP: European Pharmacopeia
EPA: Environmental Protection Agency
FAO: Food and Agriculture Organization
IARC: International Agency for Reseach on Cancer
IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry
NBS: National Bureau of Standards
NIOSH: National Institute for Occupational Safety and Health

NIST: National Institute of Standards and Technology

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPS: Organización Panamericana de la Salud

OSHA: Occupational Safety and Health Administration

SEO: Sociedad Española de Oxígeno

UE: Unión Europea

USEPA: United States Environmental Protection Agency

USP: United States Pharmacopeia

WHO: World Health Organization

WPCF: Water Pollution Control Federation



INTRODUCCIÓN



1. EL BENZO(a)PIRENO Y LOS HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) constituyen un numeroso grupo de compuestos orgánicos ampliamente distribuidos en el medio ambiente, y cuya reconocida carcinogenicidad los ha situado en las listas de los polucionantes orgánicos prioritarios.

Los PAH tienen fundamentalmente origen antropogénico: calefacciones, generadores, procesos industriales, incineración de basuras, incendios forestales, emisiones de vehículos, pavimentos asfálticos y, en general, todos los procesos de combustión y pirólisis de combustibles orgánicos fósiles son las principales fuentes de PAH (LAWRENCE, 1984; WHO, 1987; HOLOUBEK y col, 1990 a y b; KATIYAR y col., 1993).

La presencia de benzo(a)pireno (B(a)P) y otros PAH carcinógenos en los alimentos ha recibido considerable atención desde las últimas tres décadas, habiendo sido detectados y cuantificados en vegetales, moluscos, pescados, carnes ahumadas y cocinadas a la parrilla... (DERACHE, 1990).

La polución de los alimentos puede producirse tanto en origen (procesos de deposición atmosférica), como durante su manipulación y/o procesado: tratamientos térmicos severos, sustancias derivadas del petróleo utilizadas en la tecnología alimentaria, y en particular durante el ahumado, ya sea mediante métodos tradicionales o por la adición de extractos de humo que se aplican a los alimentos por adición directa, pulverización o inmersión.

La peligrosidad de estas sustancias y el hecho de que los alimentos representan el 99 % de toda la exposición del hombre a los PAH (OPS, 1985), ha inducido a los distintos organismos ocupados de la salud pública y medio ambiente, a fijar unos niveles máximos en algunos de ellos y a establecer ciertas recomendaciones con el objeto de reducir la exposición a los mismos.

Estas recomendaciones y niveles máximos hacen referencia, en el caso de los alimentos, solamente a uno de estos hidrocarburos, el benzo(a)pireno, el cual se ha usado históricamente como indicador de todo el grupo de PAH y será objeto de estudio en este trabajo.

1. 1. ESTRUCTURA

Los PAH están formados por dos o más anillos bencénicos y en algunos casos un anillo pentagonal, con o sin grupos sustituyentes sobre sus átomos de carbono e hidrógeno, pudiendo eventualmente presentar sobre su estructura átomos de nitrógeno, azufre u oxígeno (Tabla I) (KATIYAR y col., 1993). La fluorescencia de los PAH está relacionada con la presencia en su estructura de orbitales π -antienlazantes de energía inferior. La transición electrónica entre ambos tipos de orbitales es la que origina el color, y los espectros de absorción UV y de fluorescencia que los caracterizan (SHAW y CONNELL, 1994). Las figuras 1 y 2 muestran dichos espectros, obtenidos con una solución patrón de B(a)P. Para su identificación también se pueden utilizar los espectros de masas (Figura 3).

1.2. PROPIEDADES QUÍMICAS

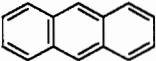
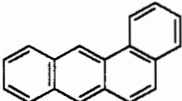
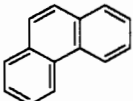
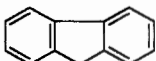
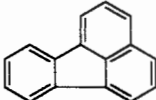
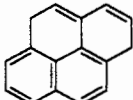
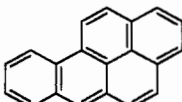
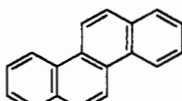
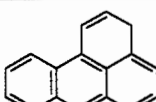
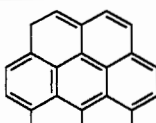
Las reacciones químicas de los PAH que tienen lugar en el medio ambiente se pueden dividir en dos grupos (GADZALA y BUSZEWSKI, 1995): reacciones de sustitución y reacciones de adición, en las que se destruyen los enlaces insaturados.

Considerando las transformaciones ambientales de los PAH, uno de los procesos de mayor importancia es probablemente la fotooxidación. Bajo la influencia de la luz del sol o de una fuente artificial de luz UV, y en presencia de oxígeno, ozono u otros oxidantes, los PAH reaccionan a peróxidos intracíclicos.

Característica de los PAH es la reacción con óxidos de nitrógeno o con ácido nítrico diluido. El B(a)P a temperatura ambiente es rápidamente transformado por el ácido nítrico diluido con ácido acético y benceno, produciendo un derivado mononitrado.

Las reacciones entre los PAH y el dióxido de azufre (en la atmósfera), trióxido de azufre o ácido sulfúrico tienen lugar a elevada velocidad, especialmente en la formación de aerosoles. Los productos de estas reacciones son hidrosolubles, como los ácidos sulfónico o disulfónico.

Tabla I - Estructura de algunos PAH identificados en los alimentos, y su actividad cancerígena.

GRUPO	COMPUESTOS	ACTIVIDAD CANCERÍGENA
 Anthraceno	Anthraceno	-
 Benzo(a)anthraceno	Benzo(a)anthraceno Dimetilbenceno(a)anthraceno Dibenzo(a, j) anthraceno Dibenzo(a, h) anthraceno Dibenzo(a, c)anthraceno Dibenzo(a, i)anthraceno	+ + + +++ + ?
 Fenantreno	Fenantreno	-
 Fluoreno	Fluoreno Benzo(a)fluoreno Benzo(b)fluoreno Benzo(c)fluoreno	- - - -
 Fluoranteno	Benzo(b)fluoranteno Benzo(j)fluoranteno Benzo(k)fluoranteno Benzo(g, h, i)fluoranteno	++ ++ + -
 Pireno	Pireno Indeno(1, 2, 3-cd)pireno	- +
 Benzo(a)pireno	Benzo(a)pireno Benzo(e)pireno Dibenzo(a, h)pireno Dibenzo(cd, ck)pireno	+++ + +++ -
 Criseno	Criseno	+
 Perileno	Perileno Benzo(g, h, i)perileno	- -
 Coroneno	Coroneno	-

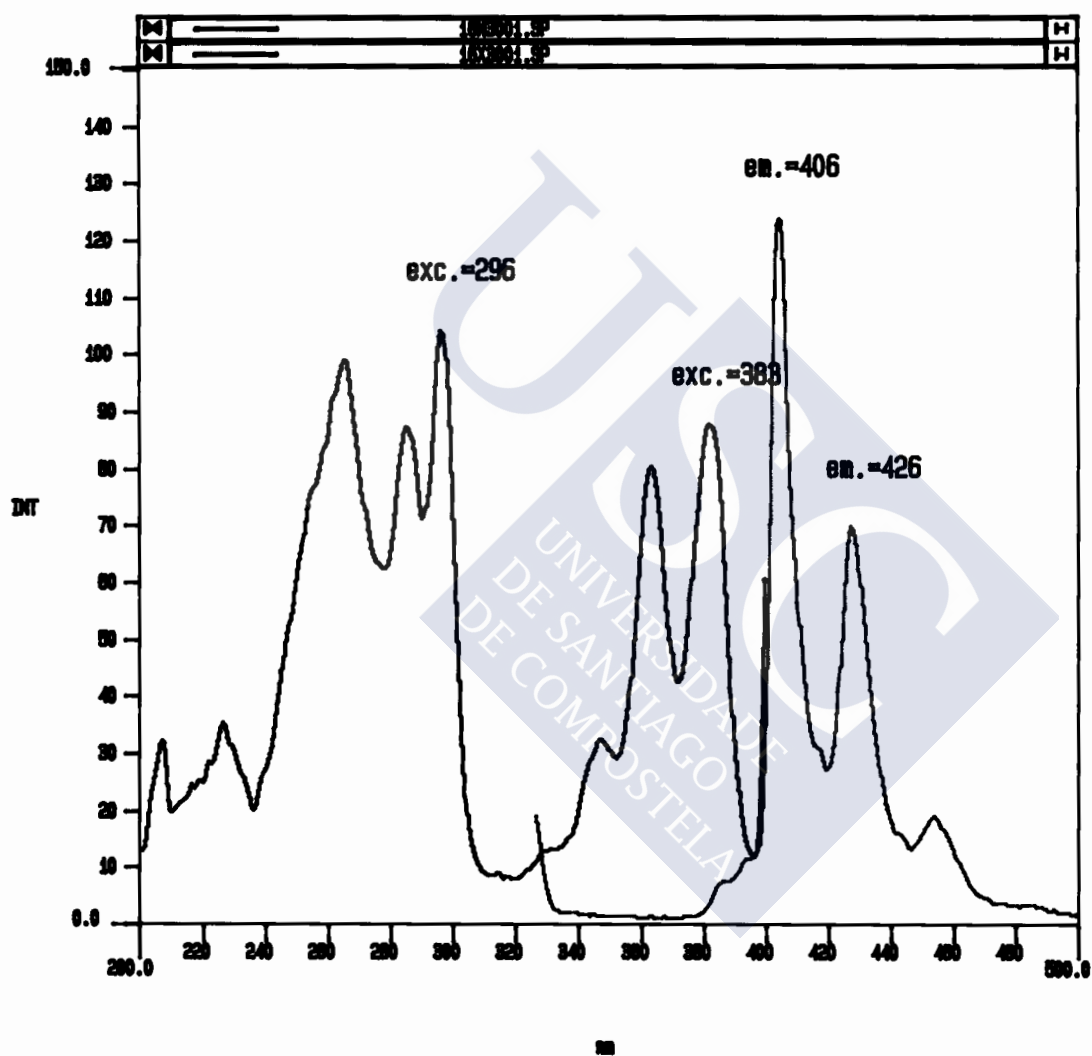


Figura 1.- Espectros de emisión y excitación del benzo(a)pireno en n-hexano

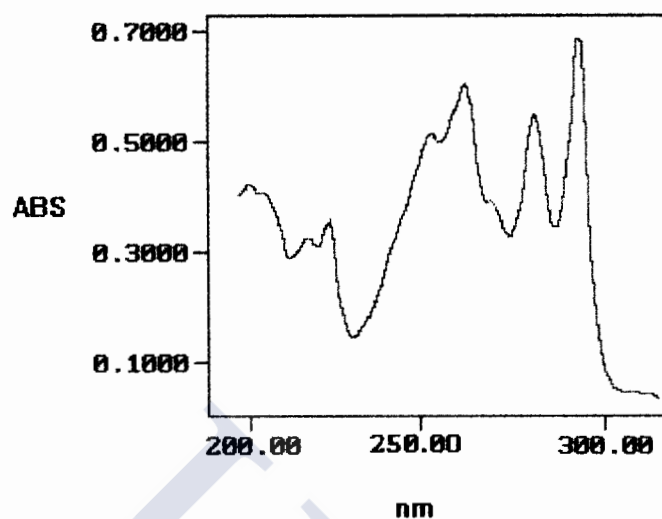


Figura 2: Espectro de UV del benzo(a)pireno en n-hexano

Entry No. 58494 of 139859

Library Name: WILEY

Name: BENZO(A)PYRENE

CAS: 50-32-8

Formula: C₂₀H₁₂

Mol Wt: 252

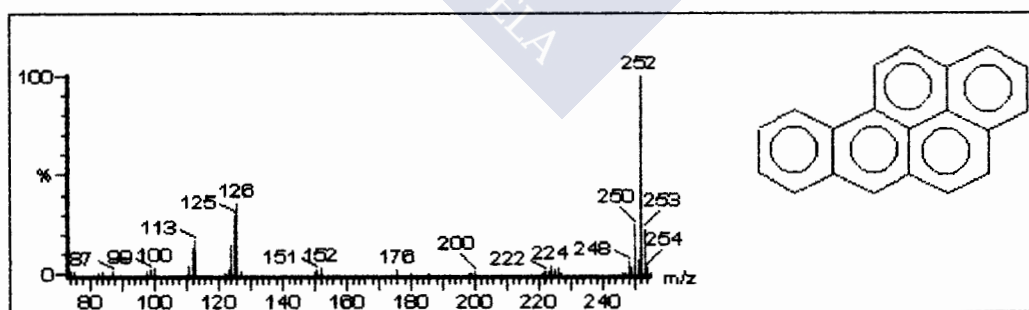


Figura 3: Espectro de masas del benzo(a)pireno

1.3. ETIOLOGÍA DE LOS PAH

Básicamente, en todo proceso en que compuestos orgánicos sean calentados a elevada temperatura o se produzca su combustión de forma incompleta se pueden originar PAH. Sin embargo, las cantidades de PAH procedentes de fuentes naturales son insignificantes comparadas con las cantidades generadas por la actividad humana.

1.3.1. FUENTES NATURALES

Las principales fuentes naturales de PAH son las siguientes:

- Procesos de biosíntesis: es conocida la presencia de PAH en alimentos no procesados de origen vegetal, moluscos y pescados de agua dulce o salada. Aunque se sugirió inicialmente que estos compuestos podían ser sintetizados por plantas, algas y bacterias en sus procesos metabólicos (HOWARD y FAZIO, 1980), esta teoría no está totalmente aceptada. Recientemente el origen de la presencia de PAH en alimentos no procesados se atribuye principalmente a la contaminación ambiental (GUILLÉN, 1994).
- Reacciones geoquímicas (síntesis *in situ* a partir de materiales biológicos degradados). Un típico ejemplo es la transformación de la materia orgánica en petróleo, carbón y pizarras bituminosas.
- Procesos naturales de pirólisis, como la actividad volcánica, incendios forestales, etc (DERACHE, 1990).

1.3.2. FUENTES ANTROPOGÉNICAS

Los PAH pueden constituir subproductos en muchos procesos químicos. Por causa de elevadas temperaturas se generan radicales libres que reaccionan entre sí formando compuestos con estructuras cíclicas condensadas. Casi todos los procesos en que compuestos orgánicos se calientan a temperaturas muy elevadas, o aquellos en que se realiza una combustión incompleta, pueden ser fuente de PAH. Se ha obtenido benzo(a)pireno y benzo(b)fluoranteno en proporciones variables en función de la temperatura, con un óptimo entre 700-750 °C (DERACHE, 1990).

La mayoría de los PAH se originan en:

- Industria: producción de alúmina, acero, asfalto, hierro, ruptura catalítica del petróleo crudo, producción de coque y hollín, etc.
- Calefacciones: calderas de calefacción central, chimeneas, estufas de carbón, madera, gas, fuel-oil, etc.
- Incineraciones: municipales e industriales, combustión de residuos, quema de rastrojos, praderas, etc.
- Transporte: vehículos de gasolina y diesel, abrasión de las llantas de los coches, etc.
- Accidentes: de especial importancia los de buques petroleros, en los que, además del gran impacto ambiental que suponen, pueden producirse incendios en los que se generan cantidades elevadas de PAH, como ocurrió con el buque "*Aegean Sea*", que naufragó en la ciudad de La Coruña, próximo a la Torre de Hércules en diciembre de 1992.
- Humo de tabaco.

1.4. PRESENCIA DE LOS PAH EN LOS ALIMENTOS

La polución de los alimentos puede producirse tanto en origen (procesos de deposición atmosférica), como durante su manipulación y procesado.

1.4.1. POLUCIÓN EN ORIGEN

Todos los procesos de combustión espontáneos, y/o provocados de forma intencionada liberan grandes cargas de PAH a la atmósfera, dispersándose en el medio ambiente. Como consecuencia pueden ser introducidos en la cadena alimentaria.

La deposición atmosférica esta considerada como la principal fuente de contaminación de vegetales. Evidencia de ello es que las plantas de hoja ancha y gran superficie (espinacas, lechugas, coles...), contienen mayores cantidades de PAH que los vegetales de hoja estrecha, lo que indica una correlación entre la superficie de la planta y la absorción de PAH atmosféricos. Este fenómeno resulta mucho más importante en las grandes zonas industriales y a lo largo de las autopistas, donde la contaminación de los

vegetales puede llegar a ser diez veces superior a la de las zonas rurales (DERACHE, 1990; MENZIE y col., 1992).

Estudios realizados en moluscos, encuentran variaciones considerables en los niveles de PAH en función del grado de contaminación del lugar del muestreo; así, las concentraciones de PAH en mejillones recogidos en áreas crónicamente contaminadas, llegan a ser de seis a cincuenta veces superiores a los recogidos en zonas más limpias. (SCHEKATURINA y col., 1995).

Los masivos vertidos de petróleo al mar durante la denominada "Guerra del Golfo" en 1991, provocaron considerables incrementos en el contenido de estos residuos en los organismos de la zona, evaluándose la media total de PAH en diferentes muestras de pescados, en 112.72 µg/Kg (expresado en materia seca), siendo los hidrocarburos más frecuentemente detectados el pireno y fenantreno. (FOOD RESEARCH INSTITUTE, 1995).

1.4.2. POLUCIÓN CAUSADA POR MANIPULACIÓN Y TRATAMIENTO

Frecuentemente se someten los alimentos a una serie de tratamientos, tanto físicos (mecánicos y/o térmicos) como químicos. Además pueden sufrir, como última transformación, preparaciones culinarias más o menos elaboradas, que implican un tratamiento térmico severo. Estos procesos pueden añadir una polución suplementaria, en ocasiones importante, a la preexistente en el alimento bruto.

Hay tres grandes fuentes responsables de la presencia de PAH en los alimentos por causa de las manipulaciones a que son sometidos: los tratamientos térmicos, las sustancias derivadas del petróleo utilizadas en tecnología alimentaria y el ahumado (DERACHE, 1990).

1) Tratamientos térmicos

Distintos trabajos experimentales han estudiado la formación de PAH durante la pirólisis de glúcidos, lípidos y proteínas, así como de aminoácidos y β-caroteno. Los principios inmediatos cuando se calientan a 300 °C no producen PAH, pero a 500-700 °C se detecta benzo(a)pireno entre otros 19 PAH identificados. Otros autores detectan la presencia de concentraciones bajas de PAH durante el calentamiento del almidón en presencia de aire a 370 °C, y más elevadas a temperaturas de 650 °C (GUNTHER y BUZZETTI, 1965). En los lípidos calentados a 400 °C se detectan cantidades traza de

PAH, pero a 700 °C se obtienen hasta 100 µg/Kg de PAH. En cambio, el colesterol produce cantidades de PAH 10 veces superiores en las mismas condiciones; la hipótesis de la intervención de su estructura cíclica podría explicar este fenómeno. Finalmente el β-caroteno solo genera cantidades mínimas de estos PAH. Es decir, que la temperatura de pirólisis tiene una función determinante en la pirosíntesis de los PAH y los mejores precursores son los lípidos.

Por otro lado, los PAH se pueden formar durante la combustión del carburante usado y quizá más importante, se forman también cuando la grasa fundida gotea sobre el mismo. Los PAH formados en la pirólisis de la grasa son difundidos a la atmósfera y parcialmente depositados en la superficie del alimento (DERACHE, 1990; MILLER, 1987).

La industria alimentaria utiliza diversos tratamientos térmicos en operaciones de transformación de materias primas como atomización, hidrogenación de grasas, torrefacción del café, tostado... Los métodos culinarios utilizan técnicas de calentamiento poco controladas: grill, horno, asado, fritura, barbacoa, cocción con una fase lipídica... La incidencia de estas prácticas sobre la aparición de PAH ha sido estudiada por numerosos autores (LIJINSKY y SHUBIK, 1964, 1965; LIJINSKY y ROSS, 1967; HOWARD Y FAZIO, 1980; LAWRENZE, 1984; MAGA, 1986; LIJINSKY, 1991; SIVASWAMY y NAGARAJAN, 1991 b; SAINT-AUBERT y col, 1992), concluyendo que son tres los factores que condicionan principalmente el grado de contaminación:

- La naturaleza de la fuente de energía utilizada.

Si la fuente consiste en un proceso de combustión, como ocurre en hornos de gas, carbón, barbacoa, se produce humo que entra en contacto con los alimentos y puede dar lugar a la aparición de PAH. El calentamiento eléctrico es una técnica más limpia.

De entre los combustibles usados normalmente en la parrilla, el carbón vegetal produce sólo pequeñas cantidades de PAH (0-1 µg/Kg), mientras que cuando el fuego se hace con maderas de abeto o de pino, se encuentran niveles algo más elevados. Distintos autores identificaron PAH en carne asada a la parrilla (Tabla II).

TABLA II. - Niveles de PAH (μg) encontrados en bistec a la parrilla (LIJINSKY y SHUBIK, 1964)

Compuesto	Por bistec (μg)	Por Kg (μg)
Antraceno	5	4.5
Benzo(a)antraceno	5	4.5
Benzo(a)pireno	9	8
Criseno	1.5	1.4
Fluoranteno	21	20
Fenantreno	12	11
Pireno	19	18

- El contacto más o menos directo con la fuente de calor.

Se ha comprobado que cuando la carne se pone en contacto directo con la llama de fuego de leña se forman cantidades significativas de PAH (entre 6 y 212 μg benzo(a)pireno/Kg), teniendo en cuenta que el rescoldo del fuego emite solo moderadas cantidades, 1-25 μg benzo(a)pireno/Kg.

El contenido en grasa de la carne parece ser de gran importancia. Esto es puesto en evidencia cuando se utiliza un combustible "limpio", tal como el carbón vegetal. Cuanto más gotee la grasa sobre el combustible, más PAH pueden formarse y depositarse en la carne. Incrementando el contenido de grasa, se observa un claro incremento de los PAH formados. Esto se puede minimizar usando parrillas especiales que eviten el goteo de la grasa o evitando la llama directa. SAINT-AUBERT (1992) evalúa la formación de PAH en alimentos cocinados en dos tipos de barbacoas geométricamente distintas, una horizontal convencional y otra vertical, en la que se evita el goteo de la grasa sobre la fuente de calor, siendo la producción de hidrocarburos de 10 a 30 veces más grande en la primera que en la segunda. También el tiempo de exposición del alimento al fuego y la proximidad de la fuente de calor son factores a tener en cuenta (Tabla III y IV).

TABLA III - Formación de Benzo(a)pireno al freir un alimento en aceite de palma (200-225 °C) durante diferentes periodos de tiempo (SIVASWAMY y col, 1991).

Tiempo (min)	Carne de carnero (µg/Kg)	Carne de pollo (µg/Kg)
10	102	ND
15	195	118
20	332	192
25	471	272

TABLA IV - Efecto de los diferentes modos de cocinado en la formación de Benzo(a)pireno (SIVASWAMY y col, 1991 a).

	Microondas* (µg/Kg)	A presión** (µg/Kg)
Carne de carnero	63	17
Carne de pollo	47	7

* Durante 4 minutos

** Durante 15 min a 121 °C

- El control de la temperatura.

Cuando en los procedimientos habituales de preparación de los alimentos se aplican temperaturas de 300-350 °C, sin riesgo de destrucción del producto, no hay producción de PAH; pero cuando no se controlan los parámetros de cocinado, son frecuentes carbonizaciones superficiales y se alcanzan localmente temperaturas que favorecen la formación de PAH.

2) Sustancias derivadas del petróleo utilizadas en la tecnología alimentaria

Cantidades importantes de parafinas y aceites minerales se utilizan para la lubricación de piezas mecánicas (que pueden ser puestas en contacto con los alimentos) y para el revestimiento interno de sistemas de empaquetamiento de cartón y polietileno, así como para desmoldar pasta de pan, galletas, o para proteger fruta y huevos contra la desecación, recubrimiento de depósitos de agua, tuberías, etc. Estos derivados pueden estar polucionados con PAH (HAENNI, 1968).

3) Ahumado

El hombre aprendió pronto a usar la madera para calentarse y para cocinar los alimentos, y utilizó el humo de su combustión para la conservación de los mismos. El consumo de alimentos ahumados crece día a día, ya no sólo por motivos de conservación, sino porque las características organolépticas de estos productos son muy apreciadas por los consumidores.

El humo se sabe que contiene cantidades apreciables de los diferentes PAH, habiéndose realizado numerosos trabajos con el objeto de controlar las condiciones de producción del mismo, de forma que la formación simultánea de estos hidrocarburos sea mínima.

Últimamente han surgido nuevas técnicas de ahumado, como el ahumado líquido, cuyo efecto conservador dista mucho de aquel que poseían los productos ahumados en la antigüedad.

- Ahumado natural

El humo se produce por combustión de la madera, que puede ser de distintos tipos. Se admite que las maderas duras son mejores que las blandas, ya que éstas últimas parece ser que generan más cantidad de hollín e imparten sabores resinosos. Las maderas duras producen más cantidad de ácidos por su mayor contenido en hemicelulosas, bajando el pH y obteniendo así productos bacteriológicamente más estables, factor que podría explicar su uso tradicional, aunque la situación es compleja y las opiniones no son unánimes. Las maderas más utilizadas son el haya, el pino, el roble, la encina, el enebro. La forma como arde la madera y el tamaño de partícula de la misma tienen influencia sobre la temperatura de combustión y consecuentemente en la composición del humo.

El humo contiene hasta un millar de compuestos de los cuales sólo un tercio han sido identificados. La combustión completa de la madera conduce a anhídrido carbónico, y la incompleta lleva a la formación de humo, como resultado de reacciones de descomposición (oxidación, polimerización, condensación) muy complejas a partir de los constituyentes esenciales de la madera : celulosa, hemicelulosa y lignina (GILBERT y KNOWLES, 1975).

La pirólisis de la celulosa, se inicia con una hidrólisis ácida a glucosa seguida de deshidratación a β -glucosano. En la pirólisis se produce ácido acético y sus homólogos y ocasionalmente pequeñas cantidades de furanos y fenoles.

La estructura de la hemicelulosa depende de su fuente, las maderas duras son ricas en pentosanas, mientras que en las blandas predominan las hexosanas. Las hemicelulosas son las menos estables al calor de los componentes de la madera y se descomponen hasta furano y ácidos carboxílicos.

De la fracción de la lignina dependen los componentes más importantes del ahumado, en particular los fenoles y ésteres fenólicos, tipificados como guayacol (en maderas blandas) y siringol (en maderas duras).

Entre los constituyentes del humo se pueden citar:

- fenoles (unos 50 identificados)
- carbonilos (cetonas y aldehídos, unos 70)
- ácidos (unos 20)
- furanos (unos 10)
- alcoholes y ésteres (unos 10)
- lactonas (más de 10)
- hidrocarburos aromáticos policíclicos (unos 30)

En la Figura 4, se muestra un hipotético esquema para la formación de benzo(a)pireno. La inicial rotura de sustancias volátiles que se originan en la descomposición de la celulosa, hemicelulosa y lignina, bajo condiciones de pirólisis da radicales metileno e hidrógeno. La dimerización de dichos radicales a etileno y sustancias de polimerización, ciclación y deshidrogenación, produce el benzo(a)pireno.

También los otros PAH pueden formarse por extensión de esta hipótesis, en base al ataque del naftaleno por los radicales mencionados, seguido de ciclodeshidrogenación (Figura 5) (TILGNER, 1968 y 1969; MULTON, 1987).

En 1954 se detectó por primera vez la presencia de benzo(a)pireno en productos ahumados, realizándose desde entonces numerosos trabajos en los que se estudia la contaminación de estos alimentos por los diferentes PAH (BAILEY Y DUNGAL, 1958; HOWARD y col., 1966 a y b; MASUDA y KURATSUNE, 1971; TOTH, 1971 y 1972;

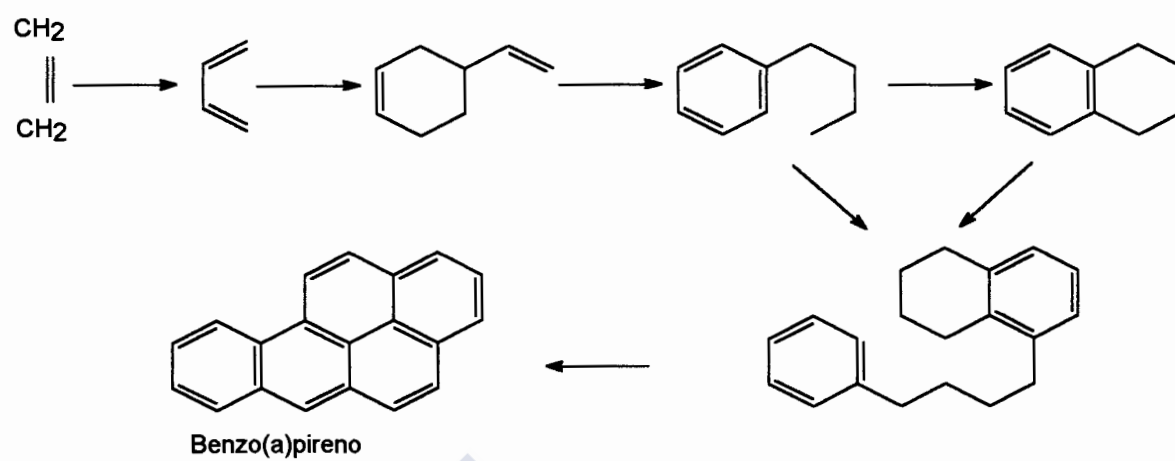


Figura 4.- Formación del benzo(a)pireno a partir de productos de descomposición de la celulosa, hemicelulosa y lignina

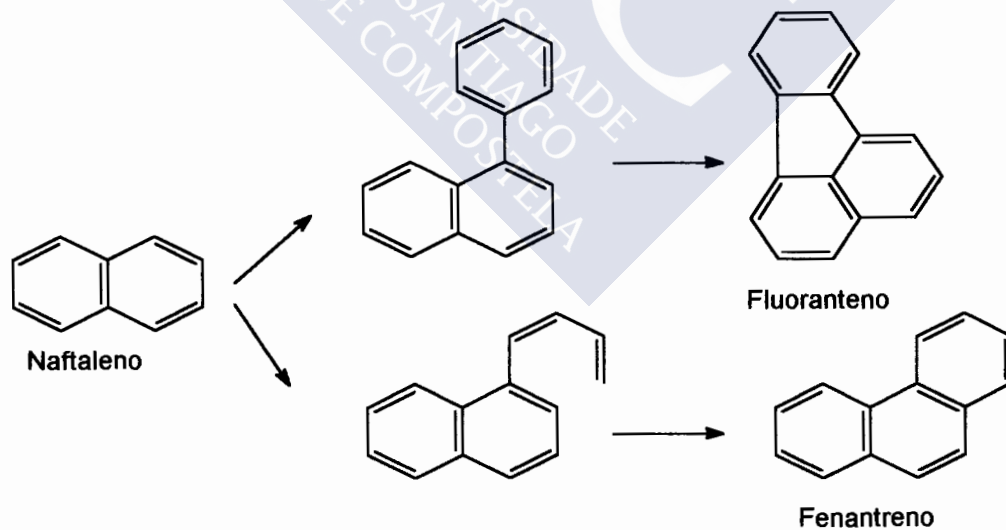


Figura 5.- Formación de hidrocarburos aromáticos policíclicos a partir del naftaleno

POTTHAST y EIGNER, 1975; FRETHEIM, 1976; SAGREDOS y col., 1981; JOE y col., 1984; ALONGUE, 1988; HANSEN y col., 1992; YUCO YABICU y col., 1993; GOMAA y col., 1993; AKPAN y col., 1994).

En los alimentos ahumados se identificaron unos 27 PAH, algunos de los cuales se recogen en la tabla V. Usualmente los compuestos de 3 anillos (antraceno y fenantreno) son productos muy comunes, presentándose en concentraciones más altas que los de 4 (benzo(a)antraceno y criseno). Afortunadamente, los PAH con 5 y 6 anillos, entre los que se encuentran los más potentes carcinógenos, se forman en muy baja cantidad. El coroneno, de 7 anillos bencénicos, a menudo se encuentra en altas concentraciones, pero no es carcinógeno (LIJINSKY, 1991).

Tabla V - Niveles de PAH en diferentes productos ahumados ($\mu\text{g/Kg}$)

PAH	Queso Cheddar	Pollo	Jamón	Bacon	Salchichas	Semi- ahumado	Ostras	Pescado blanco	Salmón
Fenantreno	10.1	1.3	-	-	1.7	1.9	14.5	-	-
Fluoranteno	3.5	1.0	1.2	1.1	0.2	0.2	15.4	3.2	1.3
Pireno	7.0	1.1	1.7	1.1	0.3	0.3	11.0	2.8	1.1
Benzo(a)antraceno	0.8	-	0.6	0.4	-	-	5.9	-	-
Benzo(b)fluoranteno	0.4	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	3.2	0.3	0.3
Benzo(e)pireno	4.8	0.8	1.4	0.5	-	0.2	36.6	3.5	2.5
benzo(a)pireno	0.5	0.1	0.2	0.1	-	-	1.9	-	-
Dibenzo(a, h)antraceno	0.1	0.1	-	-	-	-	0.7	0.5	-
Indeno(1, 2, 3- cd)pireno	0.3	-	0.2	-	0.2	-	1.3	0.7	-
Benzo(g, h, i)perileno	0.4	-	0.1	-	0.2	0.3	2.0	-	-
dibenzo(a,i)pireno	-	-	-	-	0.4	-	-	-	-
Coroneno	0.5	-	-	-	0.4	-	-	-	-

El benzo(a)pireno se ha utilizado históricamente como representante de todo el grupo de PAH debido a que presenta un gran potencial carcinogénico. A excepción del dibenzo(a,h) antraceno (BORGET y col., 1993), todos los demás PAH carcinógenos son mucho menos potentes que el benzo(a)pireno.

Condiciones de generación del humo:

En las generaciones convencionales (Figura 6), el humo se produce por combustión lenta de virutas de madera secas o húmedas sobre un suelo cuya temperatura es generalmente muy elevada (700-800 °C). Este humo es rico en alquitrán y PAH.

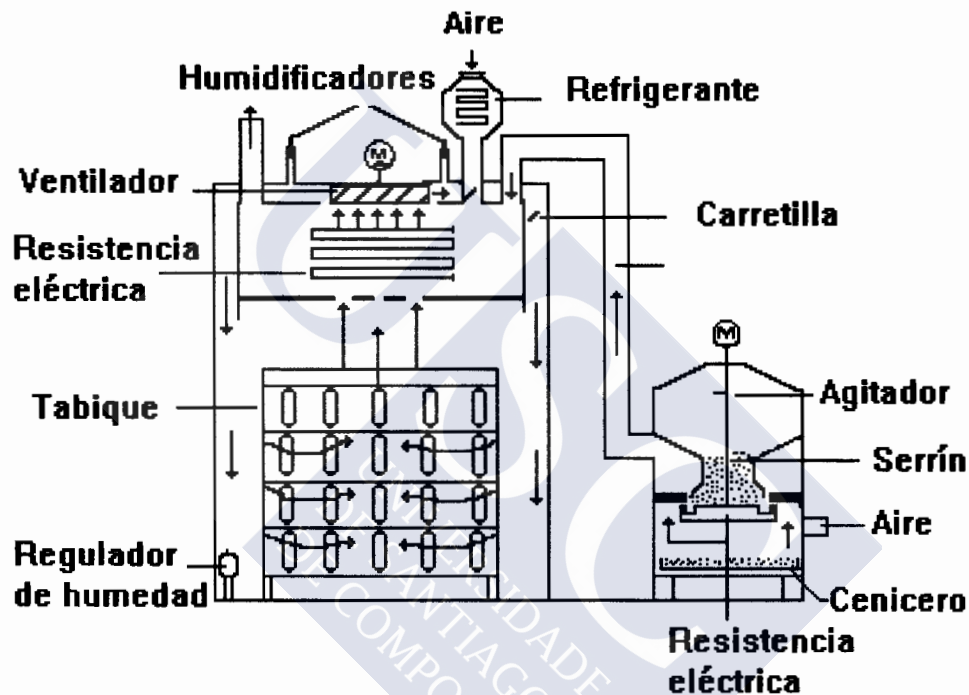


Figura 6.- Generador de humo convencional acoplado a un ahumadero tradicional

Se ha comprobado que la temperatura de generación del humo influye en su composición, incrementándose los PAH linealmente en el rango de 400 a 1000°C. De manera que cuando se obtiene el humo a temperaturas más bajas, de 300 a 400°C, se consigue una mínima producción de PAH (MILLER, 1987).

Con el fin de proporcionar humos de mejor calidad y a temperaturas más bajas, se han puesto a punto técnicas más satisfactorias, entre ellas:

- Producción de humo húmedo (envío de vapor bajo una débil presión)

- Producción de humo fluido (lecho fluido de serrín en reactor de aire comprimido)
- Producción de humo en dos etapas (primero calentamiento a 300-400 °C seguido de envío de oxígeno o aire frío a 200 °C)
- Producción de humo por carbonización de serrín comprimido con muy poco aire y calentamiento por una resistencia eléctrica)
- Producción de humo por fricción de un motor dentado girando a gran velocidad sobre un trozo de madera.

Con el fin de reducir los PAH en el humo, los fabricantes han propuesto separar la célula de producción del humo de la de ahumado. De esta forma se facilita la sedimentación de las partículas de alquitrán del aerosol, y además permite interponer entre el generador y el ahumador sistemas de filtración tales como cortinas de agua, filtros de lana y algodón, filtros electrostáticos que remueven las partículas, antes de entrar en contacto con los alimentos. Esto disminuye los PAH, aunque también los aromas deseables.

Se puede influir así mismo regulando la velocidad de generación del humo, su circulación, temperatura, humedad, y concentración de humo en la cámara.

En los alimentos ahumados, el poder de penetración de los PAH es bajo posiblemente por su alto peso molecular. Por ello las concentraciones máximas de estos compuestos ocurren en la superficie (60 a 75 %). No obstante es preciso señalar que durante la conservación puede producirse un nuevo reparto de los PAH, pudiendo difundir hacia el centro de la pieza del producto tratado. Así en los pescados ahumados, después de 40 días de conservación, se encuentra el 40- 45 % de los PAH en el interior del producto (TILGNER, 1969; GILBERT y KNOWLES, 1975; POTTHAST, 1978; MULTON, 1987).

El ahumado de productos embutidos puede reducir los niveles de benzo(a)pireno, ya que el algodón y el celofán han demostrado ser barreras efectivas para la penetración de los PAH. En el caso de las pastas finas embutidas (salchichas "*frankfurt*") si tras el tratamiento tecnológico se elimina la cubierta sintética, se obtiene un producto prácticamente libre de PAH. Cuando las cubiertas sintéticas son sustituidas por tripas naturales, la penetración de PAH es mucho mayor (70-80 %); este hecho se debe al

contenido en lípidos y proteínas de la tripa, que absorben los hidrocarburos al ser compuestos hidrofóbicos favoreciendo su penetración (GIRARD, 1991).

- Ahumado mediante aromas de humo (GUILLÉN y col., 1996)

En los últimos años el ahumado de alimentos por medio de aerosol de humo y el ahumado electrostático se están sustituyendo, cada vez con más profusión, por el empleo de aromas de humo. De hecho, actualmente se estima que siete de cada diez productos de carne ahumada en Estados Unidos se han preparado con humo líquido.

Por las características de elaboración de estos aromas, algunos organismos oficiales tales como el Instituto Americano para la Investigación del Cáncer, han recomendado el uso de humo líquido en salsas y escabeches para proporcionar sabor y olor a humo sin aumentar el riesgo de cáncer en su consumo. La seguridad de productos como el humo líquido ha sido reafirmada también por la Food and Drug Administration en 1991. A consecuencia de ello el Departamento de Agricultura de Estados Unidos ha recomendado el empleo de estos productos en las plantas cárnicas. Por otro lado la Flavor and Extract Manufacturers Association también ha incluido el humo líquido como un producto GRAS (Generally Regarded as Safe). A su vez el Comité del Consejo de Europa de Expertos en Sustancias Aromatizantes en 1992 concluye que el empleo de aromas de humo líquido con una composición conocida y segura, puede minimizar algunos de los aspectos preocupantes respecto a la salud que los alimentos ahumados pueden ocasionar.

Los aromas de humo se pueden obtener a partir de humo producido por cualquiera de las metodologías conocidas. Básicamente los compuestos generados en la combustión de la madera pueden procesarse de dos modos diferentes como se indica en la figura 7. Un procedimiento consiste en la simple condensación del humo, dando lugar a un condensado del que se debe eliminar el alquitrán y los hidrocarburos aromáticos policíclicos. Otro procedimiento consiste en retener los componentes del humo en soportes físicos que luego se emplearán en la manufactura del alimento ahumado. Como soportes líquidos se emplean agua, aceite, vinagre y soluciones hidroalcohólicas, etc. Como soportes sólidos se emplean azúcares, almidones, dextrinas, goma arábiga, especias, sales, hidrolizados de proteína y sistemas coloidales como gelatinas. Los diferentes componentes del humo, no interaccionan con la misma intensidad con los distintos soportes empleados y no quedan retenidos en la misma proporción. Por tanto las preparaciones aromáticas obtenidas de un mismo humo y distinto soporte son muy diferentes.

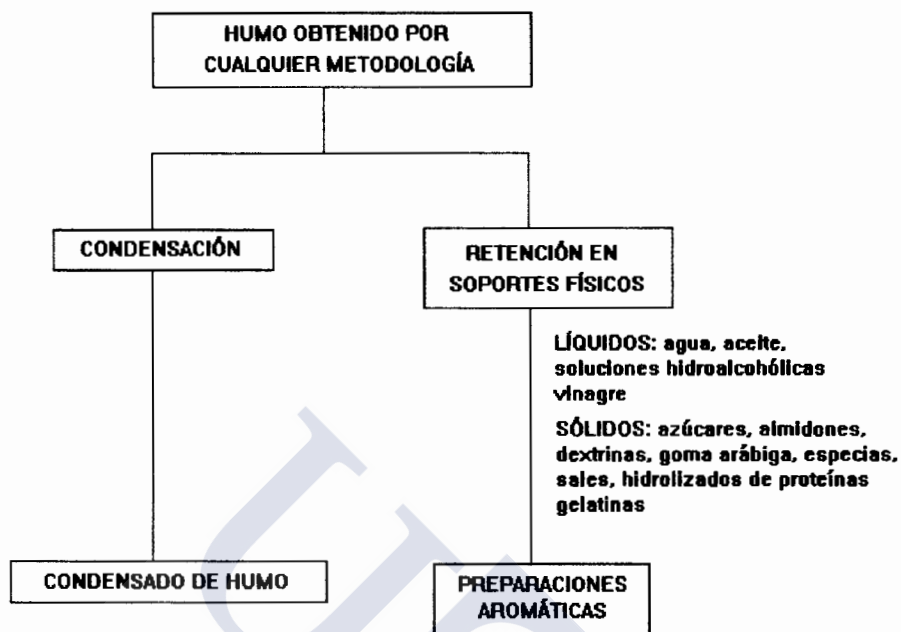


Figura 7.- Esquema de la preparación de aromas de humo

Actualmente los tipos de aroma de humo que se están empleando en la industria alimentaria pueden englobarse en ciertas categorías establecidas por los propios industriales, pudiéndose distinguir:

- Humo líquido acuoso: Es un condensado acuoso natural de humo envejecido y filtrado para eliminar las breas y el material particulado. Puede emplearse como tal o diluido para aplicaciones que requieran bajas concentraciones.
- Humo líquido soportado sobre aceite vegetal: Es elaborado a partir de una mezcla de humo acuoso con aceites vegetales.
- Condensados de humo o "superhumos": Son aromas de humo líquido altamente concentrados por lo que han de emplearse en muy bajas concentraciones.
- Preparaciones aromáticas de humo sólidas: Son las obtenidas reteniendo el humo líquido acuoso en una amplia variedad de soportes sólidos pulverulentos.

- Aromas de humo acuosos solubles: Estos aromas son efectivos cuando se requiere una dispersión inmediata del aroma en el alimento. Para favorecerla llevan generalmente incorporados emulsionantes.

- Aromas de humo acuosos tamponados: Son aromas de humo acuosos parcialmente neutralizados o tamponados para alcanzar un pH superior a 4,0. Se suelen emplear para aromatizar alimentos sometidos a curado y pueden añadirse a la salmuera de curado.

La aplicación de estos aromas al alimento puede ser muy diversa. Las formas más importantes son:

1. Adición a la mezcla: en este método el aroma se añade en dosis variables a la mezcla de los ingredientes empleados en la elaboración del alimento. Se añade normalmente a la masa durante la fabricación de los productos picados como salchichas tipo "*frankfurt*" y salchichones tipo "*salami*". Esta adición directa permite la distribución homogénea del aroma en la masa del alimento.

2. Inyección: el aroma se puede añadir a la salmuera de inyección en dosis muy variables. Este método se emplea cuando no se requiere un tratamiento de la superficie del alimento y permite también una distribución homogénea del aroma y por tanto un gusto uniforme. Esta técnica se emplea en piezas grandes como jamones y paletillas.

3. Remojo o inmersión: este método consiste en sumergir los productos a ahumar en una solución de aroma de humo un tiempo variable de 5 a 60 segundos. Esta técnica se aplica generalmente a jamones, paletillas y salchichas.

4. Pulverización: es una técnica más elaborada y de aplicación más reciente que las anteriores. El aroma de humo es pulverizado en forma de aerosol en un túnel por el cual circulan los productos a ahumar. Se emplea en el ahumado de productos tales como salchichas y jamones.

5. Mediante el ahumado de tripas y envases: este método de ahumado consiste en la inmersión de tripas en aromas líquidos o la pulverización de éstos sobre envases. Una vez impregnado el envase parte de los compuestos pasarán posteriormente al alimento cuando éste sea envasado.

Estos extractos de humo líquido, presentan numerosas ventajas sobre el ahumado tradicional, como son, ahorro de costes, menor polución ambiental, facilidad de aplicación y uniformidad en el alimento, reproductibilidad del aroma, posibilidad de graduar la intensidad de ahumado, y , lo que es más importante para la salud de los consumidores, un control de niveles de compuestos tóxicos, entre los que se encuentran los PAH (GORVATOV y col., 1971; PINO y RONCAL, 1994). GOMAA y col. (1993), estudiaron los niveles de estos residuos en alimentos procesados con humo natural y los mismos aromatizados con aroma de humo, concluyendo que los niveles de PAH cancerígenos son superiores en los primeros. Varios autores han demostrado la posibilidad de eliminar parte de estos compuestos, mediante destilación o filtrado a través de celulosa (GORVATOV y col., 1971).

1.5. TOXICOLOGÍA

La primera demostración experimental de un fenómeno de cancerización causado por una sustancia química se tuvo hace aproximadamente unos 50 años. Se trataba de dos PAH obtenidos del alquitrán de hulla. Las primeras observaciones de tipo epidemiológico, que asociaban una mayor frecuencia de ciertos cánceres de piel con actividades profesionales que implicaban contacto con hollín y alquitrán, podían finalmente explicarse científicamente. A raíz del auge de la química analítica se han podido identificar varios centenares de PAH en el medio ambiente. Se determinó que unas diez sustancias presentaban propiedades cancerígenas en diferentes órganos y en diferentes especies animales.

Posteriormente se calificó a los PAH como cancerígenos alimentarios potenciales (1950), a partir de los estudios epidemiológicos que mostraban una frecuencia elevada de cánceres de estómago en las poblaciones que consumían importantes cantidades de productos ahumados (carnes y pescados) y de la observación de que tratamientos severos aplicados a los alimentos, o ciertas prácticas tecnológicas como el ahumado, podían liberar PAH y por tanto contaminar a los alimentos (DERACHE, 1990).

1.5.1. REVISIÓN HISTÓRICA.

La primera observación de cáncer profesional de origen químico, es la de cáncer de escroto cuyo agente causal era el hollín, observado ya en 1775 en los deshollinadores, por el cirujano inglés PERCIVAL POTT.

Entre los cánceres profesionales de origen químico descritos posteriormente, hay que mencionar sobre todo los cánceres cutáneos, que aparecen en los obreros que manipulan ciertos subproductos de la hulla, fundamentalmente, los alquitranes y sus residuos de destilación (breas), o incluso ciertos productos pesados de la destilación de los petróleos crudos, y, en particular, las parafinas (cáncer de los parafinadores) y los aceites pesados (cáncer de los refinadores de petróleo).

Estas observaciones clínicas indujeron, naturalmente, a tratar de provocar experimentalmente el cáncer en animales, utilizando materiales químicos, y en particular, alquitranes. No fue hasta 1915, ciento cuarenta años después de la observación de PERCIVAL POTT, cuando mediante aplicaciones repetidas de alquitrán (dos o tres veces a la semana durante varios meses) en la cara interna de la oreja de conejos, se consiguió producir cánceres cutáneos. Sus resultados fueron confirmados y extendidos a otras especies animales. Pero los alquitranes, lo mismo que los aceites minerales pesados cuya actividad cancerígena se demostró posteriormente, son sustancias extremadamente complejas, y era necesario aislar e identificar la sustancia o sustancias responsables de su actividad cancerígena.

Este problema, extremadamente arduo, dió origen a numerosas investigaciones. Se observó, en primer lugar, que los alquitranes cancerígenos podían obtenerse a partir de productos conteniendo solamente carbono e hidrogeno. Se llegó a pensar que los principios activos estaban relacionados con el grupo químico de los hidrocarburos. Después se descubrió que las fracciones activas presentaban un espectro de fluorescencia típico comparable al de ciertos hidrocarburos policíclicos ya conocidos. Este ensayo sirvió para concentrar los agentes activos y, además orientó las investigaciones experimentales hacia los hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Efectivamente, en 1930, se demostró la actividad cancerígena del dibenzo (1,2,5,6)antraceno, hidrocarburo aromático de cinco ciclos, preparado sintéticamente. Tres años más tarde se aislaba del alquitrán de hulla, un compuesto químico de alta actividad cancerígena, el benzo(a)pireno. Se trataba de nuevo de un PAH y, en el mismo grupo químico, toda una serie de compuestos obtenidos sintéticamente se revelaron como cancerígenos. Citaremos, como ejemplo, el metilcolantreno, hidrocarburo igualmente pentacíclico que puede obtenerse por reacciones relativamente sencillas, a partir de moléculas fisiológicas, tales como el colesterol o los ácidos biliares de los que posee el esqueleto fundamental (anillo ciclopentanoperhidrofenantreno).

Si bien la actividad cancerígena no es patrimonio exclusivo de los compuestos del grupo de los hidrocarburos aromáticos altamente condensados, hay que hacer resaltar que es precisamente en este grupo en el que se encuentran los agentes cancerígenos más activos (FABRE y TRUHAUT, 1976).

1.5.2. RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD Y METABOLISMO

Las características estructurales críticas que se relacionan con el potencial carcinogénico de los PAH son la forma y tamaño molecular y la presencia o ausencia de sustituyentes en determinadas regiones del anillo bencénico. En la Tabla I se recogen la actividad carcinogénica de algunos PAH en relación con su estructura .

Los PAH son muy solubles en lípidos y se absorben con rapidez a nivel del intestino y los pulmones de los mamíferos, distribuyéndose posteriormente por vía sanguínea a una gran variedad de tejidos, con una particular implicación a localizarse en el tejido adiposo. De todas formas esta tendencia no es muy manifiesta debido a su rápido metabolismo a nivel de los microsomas, como consecuencia del cual se generan productos de excreción urinaria y sobre todo biliar y fecal como son dihidroles, fenoles y quinonas libres y conjugadas, los cuales pueden ser mutagénicos y carcinogénicos (DERACHE, 1990).

El metabolismo de los PAH se produce vía citocromo P-450 dependiente del sistema enzimático presente en el retículo endoplasmático de las células de los mamíferos y más abundantemente en el hígado, e incluye como primeras etapas la oxidación o la hidroxilación (SHAW y col., 1994). Los epóxidos o fenoles resultantes pueden sufrir detoxificación y producir glucurónidos, sulfatos o conjugados con el glutatión. Algunos de los epóxidos formados, pueden a su vez, ser metabolizados a dihidrodioles, los cuales pueden experimentar conjugación para formar productos de detoxificación solubles, o bien oxidación dando diol-epóxidos. Estos compuestos son considerados los carcinógenos últimos en los casos en los que se observa carcinogenicidad (WHO, 1984).

Los carcinógenos últimos son los metabolitos reactivos con capacidad para construir enlaces covalentes con macromoléculas e iniciar la respuesta carcinogénica. Sus precursores metabólicos inmediatos se denominan carcinógenos próximos. La mayoría de los carcinógenos, especialmente los del tipo de los PAH, son en sí mismos químicamente inertes; en su estructura está presente la información de la actividad carcinogénica, pero para llegar a ser reactivos, deben ser activados metabólicamente. La relación estructura-actividad de los carcinógenos órgano-químicos está basada en la

naturaleza electrofílica de los mismos, o bien, de alguno de sus metabolitos. La formación de enlaces covalentes con centros nucleofílicos de macromoléculas biológicas, como el ARN, las proteínas, y especialmente el ADN, es el proceso llave de la carcinogénesis química (BORGERT y col., 1993; KATIYAR y col., 1993)

1.5.3. SIGNIFICACIÓN TOXICOLÓGICA PARA EL HOMBRE

El riesgo para la salud que provoca la presencia de PAH en los alimentos, está relacionado básicamente con la posibilidad de que estas sustancias causen efectos negativos después de periodos prolongados de exposición, ya que, salvo en circunstancias excepcionales, como puede ser una polución a gran escala, es muy poco probable que surjan cuadros agudos por estas sustancias a los niveles en que se encuentran en los alimentos.

El establecimiento de valores guía, por debajo de los cuales no tengan acción, es complicado, debido fundamentalmente al desacuerdo en cuanto a la relevancia, validez y aceptabilidad de los datos científicos y, especialmente, a los problemas que plantea la extrapolación de datos toxicológicos de los animales al hombre.

Para evaluar los riesgos de la exposición humana a los PAH, la USEPA categoriza estos compuestos en carcinogénicos y no-carcinogénicos, y el procedimiento a seguir en cada caso es distinto (BORGERT y col., 1993).

Los efectos no-carcinogénicos se estiman mediante el llamado "índice de peligrosidad", que corresponde a la relación existente entre la ingesta media diaria y la ingesta diaria admisible para cada compuesto químico.

La dosis diaria admisible para el hombre se calcula dividiendo la dosis sin efectos negativos en los animales (o en el hombre, cuando se dispone de datos) por un factor de seguridad llamado factor de incertidumbre.

Este factor de seguridad responde a la incertidumbre asociada a la extrapolación de los datos animales al hombre (BORGERT y col., 1993), pero su empleo no tiene en cuenta la pendiente de la curva dosis-respuesta y, además, asume la existencia de una dosis umbral por debajo de la cual no se presentan efectos negativos, razones por las que su uso ha sido muy criticado (OPS, 1985).

La presencia de este umbral para los efectos tóxicos se ha discutido muchísimo (OPS, 1985). En algunos casos, la presencia de desintoxicación metabólica, mecanismos de restauración y procesos de eliminación indica que tal vez exista un nivel umbral, mientras que en otros casos parece que una sola molécula de una sustancia química puede iniciar un proceso que quizás lleve progresivamente al efecto nocivo observado, es decir no hay un nivel umbral cuando la molécula puede llegar al receptor apropiado. Esto último, es especialmente cierto en el caso de los PAH potencialmente carcinógenos y mutágenos, para cuya evaluación de riesgos para la salud humana se asume que solo es posible garantizar seguridad cuando el grado de exposición equivale a cero, aceptándose por tanto, la imposibilidad de fijar un nivel umbral, una dosis sin efecto, debido a los diversos factores que intervienen y que son poco conocidos (DERACHE, 1990):

- 1) las causas multifactoriales de los cánceres humanos,
- 2) los fenómenos de co-cancerogenicidad o incluso de la inducción debida a sustancias no cancerígenas,
- 3) las dificultades de extrapolación del animal al hombre.

Por ello y debido a la falta de metodologías que permitan una evaluación más precisa de los riesgos, los Organismos Internacionales han adoptado una actitud prudente frente a los PAH, tanto de los cancerígeno efectivos, activos por vía oral u otras vías, como de los que no son activos por ellos mismos pero pueden actuar como co-cancerígenos, estos últimos más frecuentes.

El 37º Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en aditivos alimentarios (1991) en la evaluación del benzo(a)pireno, reconoció que éste era sólo uno más de los 100 compuestos pertenecientes a la familia de los PAH encontrados en los alimentos y que éstos se debían considerar como grupo.

Dicho producto administrado por vía oral a ratones, ocasionó tumores del cardias y pulmones, y en ratas, los pocos estudios realizados mostraron tumores de esófago, cardias y glándula mamaria.

Se han observado tumores a nivel del tracto digestivo en roedores, por administración de varias dosis que en conjunto representan unos 40 mg/Kg de PAH cancerígenos. Aunque dichas dosis son prácticamente inalcanzables teniendo en cuenta la esperanza de vida actual, si hay que considerar la posible presencia de "promotores" y factores nutricionales que pueden incrementar los efectos tóxicos.

El Comité señaló, que el Organismo Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer había encontrado pruebas poco fehacientes de la carcinogenicidad de esta sustancia en el ser humano, pero suficientes para comprobar su carcinogenicidad en animales y su actividad en pruebas breves de genotoxicidad.

El Comité estimó la ingesta diaria de benzo(a)pireno, mediante datos de otros estudios sobre la concentración presente en los alimentos. Esos datos demostraron que existen amplias concentraciones de dicha sustancia en los alimentos y que éstas dependen de factores tales como el lugar en el que se produjeron (zona industrializada o no), el método de elaboración (ahumado o secado) y la forma en que se cocinaron (asados con carbón). A su vez, la ingesta dietética varió mucho y algunos consumidores estuvieron expuestos a altas concentraciones de estos productos.

Se debe por tanto reducir la exposición al benzo(a)pireno y otros PAH. Además la exposición al primero constituye sólo una mínima parte de la exposición de los consumidores a los segundos y, otros compuestos de esta clase tienen propiedades toxicológicas similares a las del benzo(a)pireno, y por tanto pueden contribuir al riesgo carcinógeno en general.

Las medidas a tomar a nivel individual serían:

- lavado de frutas y verduras, para retirar cualquier polución de la superficie.
- retirar el exceso de grasa de la carne para asar
- evitar en la preparación de los alimentos su contacto directo con la llama

Las industrias pueden tomar otras medidas como:

- conversión a calentamiento indirecto para el secado de los alimentos
- uso de tostadores con combustible distinto de carbón
- uso de envolturas protectoras cuando se ahuman los alimentos
- observación de los límites de las concentraciones de PAH en los aditivos alimentarios.

1.5.4. EXPOSICIÓN HUMANA A LOS PAH

La exposición del hombre a los PAH se produce en forma muy variada, dada la ubicuidad de estos compuestos en el medio ambiente en general, ubicuidad que es debida fundamentalmente a un fenómeno de diseminación que tiene lugar a partir de un foco principal: el aire. Los PAH liberados en la atmósfera, como consecuencia de los distintos

procesos de combustión espontánea o provocada, sufren deposición atmosférica y entran en contacto con el agua, suelos y plantas, introduciendo así en la cadena alimentaria.

Así pues, la exposición del hombre a los PAH en general y al benzo(a)pireno en particular, se produce básicamente por medio de los alimentos, el agua y el aire (OPS, 1985). En todos los casos, la contribución relativa del agua potable a esta exposición se ha estimado entre el 0.1 y el 0.3 % del total de los PAH ingeridos. Se ha calculado que la exposición a los PAH en el aire constituye el 0.9 % de la exposición total. En consecuencia los alimentos contribuyen en casi el 99 % de toda la exposición a PAH.

Los niveles de contaminación medidos en los diferentes tipos de alimentos pueden determinar una sobrestimación de la contaminación real de nuestra alimentación, debido a que siempre se consideran las situaciones más desfavorables: ahumado y tratamiento térmicos severos, alimentos producidos en zonas contaminadas...

MENZIE y col. (1992) evaluaron la dosis potencial de PAH cancerígenos en tres dietas tipo estadounidenses, entendiendo por dosis potencial la cantidad ingerida y absorbida asumiendo una biodisponibilidad del 100 %.

- Dieta media: La ingesta de PAH cancerígenos se estima entre 1-5 µg/día, siendo los cereales no refinados y las carnes cocinadas los alimentos que más contribuyen.

- Dieta rica en carne: La dosis potencial de PAH en este tipo de dieta es mayor, del orden de 6 a 9 µg/día, siendo en este caso las carnes ahumadas o a la parrilla, y los pescados, las mayores fuentes de contribución.

- Dieta vegetariana: Pueden llegar a contener mayores cantidades de hidrocarburos que las dietas medias siempre que incluyan vegetales con grandes hojas (espinacas, acelgas, lechugas, coles...) y cereales no refinados. Este hecho se debe, como se ha explicado anteriormente, a la contaminación de los vegetales debido a la deposición atmosférica.

Los cereales contribuyen en gran medida a la ingesta de PAH en cualquiera de las tres dietas estudiadas, observándose que este aporte es mayor cuando los cereales no sufrieron refinado. De todas formas, no quiere decir esto que contengan grandes cantidades potenciales PAH, sino que los cereales constituyen el componente mayoritario del total de la dieta.

En cuanto a la dosis potencial global de PAH carcinógenos (considerando las diferentes vías de entrada), según estos autores, se estima en una media de $3\mu\text{g}/\text{día}$ y un máximo de $15\mu\text{g}/\text{día}$ para varones adultos no fumadores, dosis que puede verse aumentada considerablemente, llegando incluso a duplicarse, en el caso de fumadores sin filtro.

LODOVICI y col. (1995) evalúan las dosis medias diarias de PAH ingeridas por un consumidor italiano, estimando en este caso que la ingesta diaria de PAH totales debida a los alimentos es de $3\mu\text{g}/\text{día}$, contribuyendo los cancerígenos en $1.4\mu\text{g}/\text{día}$. Los resultados confirman que al igual que en la dieta estadounidense, son los cereales y los vegetales los que aportan mayores concentraciones de estos tóxicos a la dieta. Por el contrario alimentos que contienen altas dosis potenciales de PAH, como son las carnes cocinadas a la barbacoa o a la parrilla y los ahumados, solo contribuyen marginalmente al total ingerido, por el bajo consumo de estos alimentos en Italia. También es interesante resaltar que en la dieta italiana, las bebidas constituyen un aporte importante, debido al considerable consumo de café.

1.6 LEGISLACIÓN

Los PAH son objeto de disposiciones específicas en algunos países, mientras que en otros están incluidos en el grupo particular de sustancias cancerígenas o dentro del grupo de sustancias de riesgo.

El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos alimentarios en su 31º Informe (1987) consideró el uso de aromas de humo de forma genérica, teniendo en cuenta que reemplazan las técnicas tradicionales de ahumado y que ello presenta una mejora definitiva, puesto que durante la producción de sabores se elimina un gran número de compuestos potencialmente tóxicos.

El Comité consideró así mismo que quizá no sea posible asignar un IDA a tan complejo grupo de productos, y concluyó que los sabores de humo para los que existen normas apropiadas, se podrían emplear provisionalmente para dar sabor a los alimentos sometidos tradicionalmente a ahumado.

En la CEE (actualmente la UE), la Directiva 88/388 del Consejo de 22 de junio de 1988 referida a los aromas que se utilizan en los productos alimenticios, entiende por aroma de humo, un extracto de humo utilizado en los procedimientos tradicionales de ahumado, y establece los contenidos máximos de determinadas sustancias indeseables

presentes en los productos alimenticios consumidos sin preparación y debidos a la utilización de aromas, limitando el benzo(a)pireno a un máximo de 0.03 µg/Kg en productos alimenticios y bebidas.

Esta normativa ha sido adoptada con posterioridad en España, en el Real Decreto 1477/1990 de 2 de noviembre, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria de los aromas que se utilizan en los productos alimenticios y de los materiales de base para su producción.

En España está permitido el uso de 2 aditivos: 41700000 (humo natural extracto) y 41700001 (humo artificial) que pueden ser utilizados en determinados derivados cárnicos y quesos (MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO, 1987). En estos últimos, la Norma de calidad para quesos y quesos fundidos destinados al mercado interior (ORDEN de 29 de noviembre de 1985 y 3 de mayo de 1988) y, exclusivamente, para quesos curados, admite dentro de los coadyuvantes tecnológicos el proceso de ahumado, indicando que el humo puede ser aplicado directamente a la corteza en el proceso de ahumado sin que la concentración de 3,4-benzopireno sea superior a 0.01 ppm en la misma, y siempre que no se utilice para enmascarar defectos.

La Directiva 91/493/CEE de 22 de julio por la que se fijan las normas sanitarias aplicables a la producción y puesta en el mercado de los productos pesqueros establece, dentro de los requisitos para productos transformados que "las operaciones de ahumado deberán realizarse en un local separado o emplazamiento destinado al efecto que, en caso necesario, estará provisto de un sistema de ventilación que impida que los humos y el calor de la combustión afecten a los demás locales y emplazamientos en los que se preparen, transformen o almacenen los productos pesqueros.

a) Los materiales empleados para la producción de humo para el ahumado de pescado, deberán almacenarse apartados de la zona de ahumado y utilizarse de forma que no contaminen los productos.

b) Deberán prohibirse los materiales empleados para la producción de humo por combustión de madera que haya sido pintada, barnizada, encolada o que haya sufrido cualquier tratamiento químico para su conservación.

c) Tras ser ahumados, los productos deberán enfriarse rápidamente a la temperatura necesaria para su conservación antes de su embalaje."

La presencia de estos compuestos en el resto de los alimentos no está sometida en nuestro país a ninguna reglamentación, si bien en la CEE se proyecta fijar como Límite Máximo Residual (LMR) para el benzo(a)pireno, un máximo de 1 µg/Kg y prohibir prácticas drásticas como el calentamiento directo a la llama; este mismo requisito ya ha sido establecido por otros países como la República Federal Alemana y Austria (DERACHE, 1990).

1.7. FICHA TÉCNICA DEL BENZO(a)PIRENO*

SINÓNIMOS: Benzo(d,e,f)criseno; 1,2-benzopireno; 3,4-benzopireno; 6,7-benzopireno; 3,4-benz(a)pirene; benz(a)pireno.

CAT NO. F73

CAS NO. 50-32-8

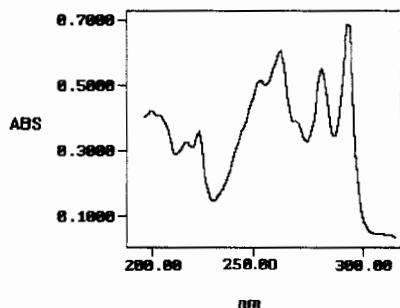
ESTRUCTURA, FÓRMULA EMPÍRICA Y PESO MOLECULAR



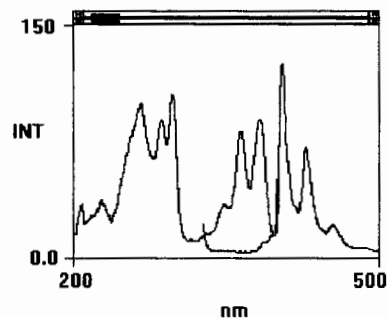
C₂₀H₁₂

PM: 252

ESPECTRO DE UV



ESPECTROS DE FLUORESCENCIA



DATOS DE TOXICIDAD

Dosis letal 50 vía oral en ratas o ratones: 4095 mg/Kg

Ligeramente tóxico+

Carcinogenicidad: Occupational Safety and Health Administration (OSHA): (NO); International Agency for Research on Cancer (IARC): (NO); American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH): (YES); National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH): (NO); OTROS: (NO)

DATOS FÍSICOS

Punto de fusión: 176.6-177.5 °C

Punto de ebullición: 488-495 °C

Densidad: no disponible

Presión de vapor: no disponible

Densidad de vapor: no disponible

Velocidad de evaporación (acetato de butilo=1): no disponible

Olor: no disponible

Color: amarillento

Fase: sólido cristalino

Solubilidad en agua: insoluble (inmiscible)

PELIGRO DE EXPLOSIÓN E INCENDIO

Punto de inflamación: dato no disponible

Medio de extinción: dióxido de carbono, polvo seco o spray. No se disponen de límites de explosión para este compuesto.

PELIGROSIDAD PARA LA SALUD

No se deben llevar lentes de contacto en el laboratorio.

Se deben considerar peligrosos todos los productos químicos- Evitar el contacto físico directo.

Carcinógeno sospechoso- Puede producir cáncer. Puede ser perjudicial si se absorbe a través de la piel. Puede ser perjudicial si se inhala. Puede ser perjudicial si se traga. Puede causar irritación en los ojos. Puede causar irritación en la piel. Polvo y/o

vapores pueden causar irritación en el tracto respiratorio. Puede ser irritante para las membranas mucosas. Se puede absorber rápidamente a través de la piel con efectos potencialmente adversos para la salud.

DATOS DE REACTIVIDAD

Se absorbe y retiene con facilidad en ropas y/o calzado.

Incompatible con agentes oxidantes fuertes. La descomposición libera vapores tóxicos.



* Datos extraídos de la documentación aportada por la casa comercial suministradora de los reactivos químicos CHEM SERVICE, Inc. PO BOX 3108, WEST CHESTER, PA; 19381 (215) 692-3206, que incluye certificado de análisis y hoja de datos de seguridad del material.

+ Esta declaración está basada en la DL50 = fijada por la OSHA

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS



La determinación de PAH sigue siendo un gran desafío para los analistas, ya que constituyen un complejo grupo de sustancias, que se presentan en concentraciones muy bajas y en matrices complejas que deben ser monitorizadas según especifican las distintas legislaciones y organismos relacionados con la salud pública y medio ambiente, en un gran número y diversidad de muestras, para lo que se hace necesario disponer de técnicas analíticas sensibles y rápidas que puedan ser utilizadas en las bases de la rutina para el control efectivo de estos compuestos.

Con el fin de facilitar las tareas investigadoras relacionadas con la determinación de PAH, el National Institute of Standards and Technology (NIST) (anteriormente llamado National Bureau of Standards (NBS)) y el Bureau de Communauté de Référence (BCR) han preparado una serie de materiales de referencia estándar que permiten al analista lograr tres propósitos básicos: a) calibrar los sistemas de medida, b) validar la fiabilidad y precisión de nuevos métodos analíticos, y c) disponer de un control de calidad de análisis de rutina, mediante el análisis de los materiales de referencia estándar a intervalos de tiempo regulares y apropiados.

Entre los materiales de referencia estándar para la determinación de PAH además de los que corresponden a los compuestos individuales en estado puro, hay dos soluciones de calibración que contienen en acetonitrilo (ACN) los dieciseis PAH incluidos por la USEPA en la lista de polucionantes orgánicos prioritarios (SRM No. 1647 y 1647a), y otra que contiene a mayores otros ocho PAH, en este caso en una mezcla de n-hexano/tolueno (SRM No.1491) (WISE y col., 1988).

En lo que se refiere a los materiales que reproducen las matrices de alimentos, su elaboración presenta grandes limitaciones por la dificultad del análisis de trazas de estos residuos.

En un programa coordinado por el BCR (1988), catorce laboratorios experimentados compararon diferentes métodos para el análisis de cinco PAH (pireno, benzo(e)pireno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-cd)pireno, benzo(g,h,i)perileno) en dos tipos de alimentos, aceite de coco y col pulverizada, con el fin de conseguir su certificación como materiales de referencia. La falta de concordancia en los datos obtenidos no lo hizo posible. En 1990 se repitió nuevamente la experiencia, obteniéndose en esta ocasión resultados satisfactorios, siendo por tanto factible la elaboración de estos dos materiales de referencia (VAESSEN y col., 1988 y 1990).

Tras un tercer estudio en 1993, el BCR finalmente llegó a la conclusión de que, de los materiales estudiados, el más adecuados para reproducir una matriz representativa para el análisis de PAH en alimentos era el aceite de coco, por ello actualmente se está trabajando en la elaboración de un blanco de aceite de coco virtualmente libre de PAH, y este mismo aceite sobrecargado con 6 hidrocarburos, pireno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-cd)pireno, benzo(g,h,i)perileno y criseno. Como se puede observar, el benzo(e)pireno, utilizado inicialmente, ha sido sustituido por el benzo(k)fluoranteno. Este último tiene un mayor poder carcinógeno, y también se ha añadido a la lista el criseno, ya que es un frecuente polucionante de los alimentos (VAESSEN y col., 1993).

Por su parte, el NIST, elaboró recientemente como material de referencia un homogeneizado de mejillón (SRM, 1974), en el que ha sido certificada la concentración de nueve PAH (fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, perileno, benzo(b)fluoranteno, benzo(a)pireno, benzo(g,h,i)perileno e indeno(1,2,3-cd)pireno (WISE y col., 1991; WISE y col., 1993).

Los PAH se hallan a niveles traza, de modo que resulta difícil extraerlos y aislarlos de los medios donde se encuentran, y particularmente de los alimentos, en especial de aquellos ricos en sustancias lipídicas (pigmentos lipófilos y lípidos propiamente dichos), por la débil polaridad de estos compuestos.

En los últimos años se han publicado numerosos métodos para la determinación de PAH en alimentos. Estos métodos difieren en detalle, pero casi todos incluyen extracción, purificación y análisis. La extracción se realiza mediante el uso de solventes orgánicos, por distintas técnicas que pueden incluir saponificación previa, extracción en soxhlet, ultrasonidos, etc. La purificación se lleva a cabo mediante cromatografía en capa fina, cromatografía en columna o partición líquido-líquido, y en la identificación se emplean fundamentalmente la GC-FID o GC-MS, HPLC-FL, HPLC-UV y la espectrofotometría de fluorescencia.

Una revisión de tales métodos, con más de 100 referencias, ha sido realizada por GUILLÉN (1994), en el cual se hace un interesante análisis de las posibles técnicas a utilizar en la consecución de las distintas etapas que conforman el proceso analítico completo.

1. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN

1.1. ALIMENTOS

El primer método para la determinación de PAH en alimentos, elaborado a través de estudios de colaboración de diferentes grupos de investigación, aceptado como método oficial por la AOAC (Association of Official Analytical Chemists) y como método recomendado por la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), fue descrito a principios de 1970. El método fue inicialmente elaborado para la determinación de B(a)P y más adelante se extendió a otros PAH. El procedimiento incluía una inicial saponificación del producto con potasa etanólica, partición líquido-líquido con dimetilsulfóxido (DMSO) y un solvente alifático, y purificación mediante columna cromatográfica de florisil. Como técnica de separación utilizan la cromatografía en capa fina (TLC) sobre celulosa y acetato de celulosa, analizando los PAH mediante espectrofotometría UV y FL (FAZIO y col., 1973).

A partir del año 1970, fueron muchas las metodologías que se desarrollaron para evaluar estos compuestos en los alimentos.

MASUDA y col. en 1971 extraen mediante maceración con benceno 16 PAH en pescados ahumados, seguido de purificación a través de alúmina activada, separación de los PAH mediante cromatografía de papel y análisis por espectrofotometría UV. Las concentraciones de B(a)P encontradas oscilaron entre 2 y 37 $\mu\text{g/Kg}$.

El esquema propuesto por GRIMMER Y BÖNKE en 1975, para el análisis de PAH de 3 a 7 anillos, en alimentos grasos y con alto contenido en proteínas, se recoge en la figura 8. Estos autores consideran que la extracción de PAH en muestras insolubles como pescados y carnes, la saponificación es totalmente necesaria, no siendo así en aquellas matrices solubles en ciclohexano o metanol (aceites, margarinas, mantequillas...). Este método, aunque con algunas modificaciones, fue posteriormente utilizado para determinación de PAH en salchichas ahumadas (FRETHEIM, 1976), lechuga (LARSSON y SAHLBERG, 1981; LARSSON, 1985), granos de centeno (LARSSON, 1985), productos cereales (TUOMINEN y col., 1988), muestras de la dieta en general (DENNIS y col., 1983, 1984, 1991; DE VOS y col., 1990), remolacha azucarera y comida para animales (LARSSON y col., 1990), granos de trigo (LARSSON y col., 1991), pescados frescos y ahumados (AKPAN, 1994) y carnes asadas sobre carbón (NOLL y col., 1995).

Algunos autores sugieren, en cambio, que el tratamiento alcalino de las muestras, puede provocar la degradación de los PAH más lábiles (POTTHAS y EIGNER, 1975; GRIEST y CATON, 1983).

POTTHAS y EIGNER, en 1975 desarrollan un nuevo método para el análisis de PAH en alimentos ahumados evitando la saponificación con potasa. La muestra se mezcla homogéneamente con sulfato sódico y celita, y se extrae por maceración con cloroformo, el solvente se evapora a sequedad en rotavapor a 40 °C durante 2 horas (lo que puede provocar pérdidas de algunos hidrocarburos aromáticos). Los PAH, adsorbidos junto a los componentes grasos en la celita, se eluyen con carbonato de propileno, que es según estos autores el solvente en el que estos compuestos son más solubles. El eluato obtenido, prácticamente libre de grasas, se mezcla con hidróxido sódico, para hidrolizar el carbonato de propileno, extrayendo los PAH de esta solución alcalina con eter de petroleo, que se purificará posteriormente a través de celita y florisil.

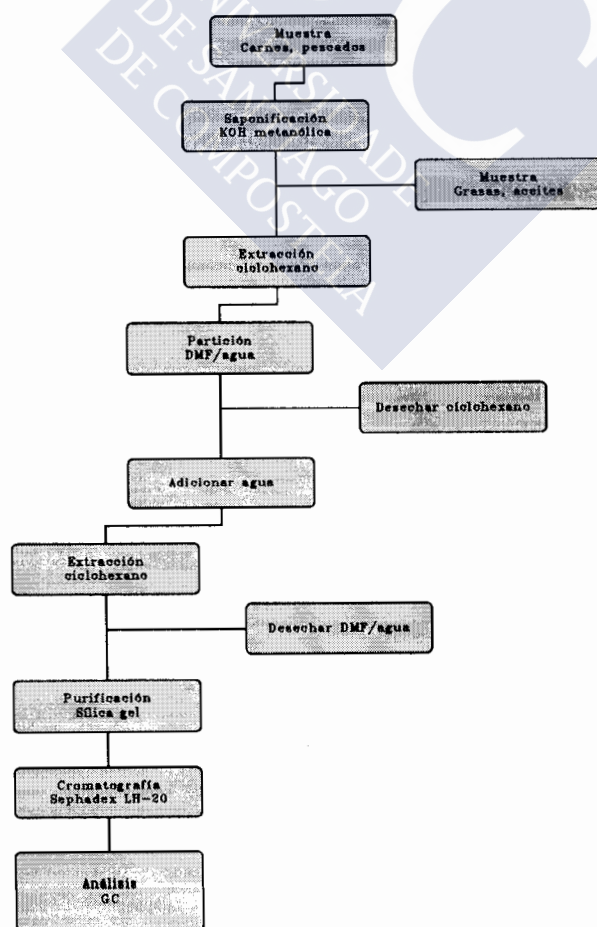


Figura 8: Método propuesto por Grimmer y Bohnke (1975)

El carbonato de propileno será utilizado posteriormente por otros autores como ALONGUE, 1988; PFANNHAUSER, 1991 a y b (figura 9).

Un método alternativo para la determinación de benzo(a)pireno en alimentos ahumados fue desarrollado por SAITO y col. en 1978. Tras hidrólisis alcalina, la muestra se extrae con n-hexano y se purifica a través de sílica. El benzo(a)pireno se extrae del eluato de n-hexano de forma selectiva con ácido sulfúrico concentrado, y tras una segunda purificación de nuevo mediante sílica, se analiza por espectrofluorimetría y GC. Este método ha sido utilizado para determinar B(a)P en alimentos ahumados (OGBADU y OGBADU, 1989).

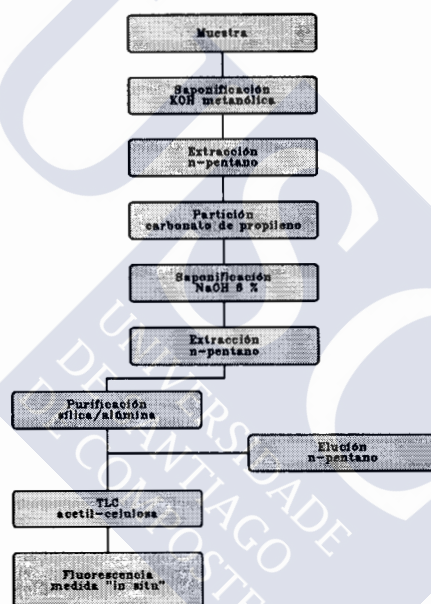


Figura 9: Método propuesto por Pfanhauser (1991 a)

JOE y col. (1984) proponen un método para el análisis de alimentos ahumados en el que se realiza también un previo tratamiento alcalino de la muestra, utilizando en este caso como solvente de extracción el 1,1,2-tricloro-1,2,2-trifluoroetano, purificándolo posteriormente a través de columna cromatográfica de sílica gel. Al eluato una vez purificado, se le añaden 10 mL de DMSO y se evapora bajo corriente de nitrógeno. Al residuo obtenido se le añade agua destilada, y se extrae con ciclohexano, que se purifica finalmente mediante alúmina. El análisis se realiza mediante HPLC con detector de UV y FL.

SIVASWAMY y col. en 1991(a) determinan PAH en alimentos sometidos a combustión, mediante extracción con diclorometano, desecación con sulfato sódico, evaporación y posterior disolución en ciclohexano, purificación a través de sílica, evaporación a sequedad, disolución en ACN y análisis por HPLC, detectando criseno, dibenzoantraceno y benzo(a)pireno, con recuperaciones del 89.75, 90.30 y 92.07 % respectivamente. Este método es utilizado por los mismos autores (b) para estudiar los PAH que se forman en las carnes de cordero y pollo en función del tratamiento culinario, y para identificar y cuantificar los PAH en alguno de los platos alimenticios comunmente consumidos en el sur de la India.

SAINT-AUBERT y col. en 1992, investigan niveles de seis PAH y particularmente benzo(a)pireno, por HPLC-FL en muestras de carne y pescado asadas a la parrilla. El procedimiento consiste en saponificación, extracción con ciclohexano, purificación por florisil y elución con tolueno. El extracto se disuelve en n-hexano y extrae con DMSO. El residuo disuelto en metanol se inyecta. La recuperación es de 80 ± 10 % y el límite de detección $0.1 \mu\text{g/Kg}$.

El análisis de PAH en aceites vegetales, ha sido objeto de gran atención en los últimos años, empleándose diferentes métodos para este estudio. KOLAROVIC Y TRAITLER (1982) extraen PAH de grasas y aceites vegetales, mediante complejación con cafeína en ácido fórmico, de manera similar a la propuesta por SAGREDOS y col., en 1981 para el análisis de estos residuos en alimentos ahumados. El método propuesto por MENICHINI y col., (1991 a y b), incluye, disolución de 10 g de aceite en n-pentano, extracción con DMSO, partición líquido-líquido con ciclohexano tras adición de agua, purificación a través de sílica gel, separación mediante cromatografía en capa fina, y, finalmente análisis por cromatografía de gases. VREULS y col. (1991), tras disolución de 1 g de aceite en 10 mL de n-pentano utilizan, para la identificación y cuantificación de nueve PAH, una combinación en serie de LC, GC y MS. A su vez, GERTZ (1994) realiza un tratamiento alcalino de la muestra y extrae los hidrocarburos mediante distribución en diclorometano, ciclohexano y agua, analizándolos por HPLC-FL.

La presencia de PAH, también ha sido muy estudiada en una gran variedad de organismos marinos. WARNER (1976), describe un método apropiado para el análisis simultaneo de hidrocarburos aromáticos y alifáticos, que consiste en, una digestión alcalina de la muestra, extracción con eter y cromatografía con sílica gel. Un método alternativo, fue propuesto por VASSILAROS y col. (1982a), la muestra se somete a saponificación con potasa y se extrae con diclorometano (según estos autores solvente de gran efectividad para disolver mezclas de compuestos aromáticos y alifáticos), el

eluato obtenido se lava con agua y potasa al 10 % (p/v) y se pasa a través de columna cromatográfica de alúmina, eluyendo los compuestos alifáticos con n-hexano, los PAH/PAHS con benceno y los PAHN con cloroformo; realizando el análisis mediante GC-FID, y confirmación por GC-MS.

TAKATSUKI y col. (1985), determinan PAH en moluscos y pescados; prestando gran atención a las posibles degradaciones de los hidrocarburos más lábiles. La muestra es saponificada mediante potasa etonólica y extraída con n-hexano, purificando el eluato obtenido con sílica. Como solvente de elución utiliza una mezcla de etil-éter y n-hexano, analizando los hidrocarburos mediante HPLC-FL. Las precauciones a tener en cuenta para obtener recuperaciones satisfactorias son: protección de la luz a lo largo de todo el proceso analítico, adición de un antioxidante (sulfuro de sodio) durante la digestión alcalina, eliminación de los posibles peróxidos en el etil-éter inmediatamente antes de su uso y rápida elución de los analitos adsorbidos en la columna cromatográfica de sílica.

KRAHN y col. (1988) y MOTHERSHEAD y HALE (1992) analizan moluscos, utilizando diclorometano como solvente extracción al igual que VASSILAROS y col., (1982a) pero en este caso sin saponificación previa de la muestra. El extracto obtenido es purificado mediante columna de sílica gel/alúmina y posterior GPC.

BIRKHOLZ (1988) también desechan el método de la hidrólisis alcalina por ser largo y complicado, especialmente el aquellos pescados con alto contenido en lípidos, y sugieren la extracción de la muestra con diclorometano en Soxhlet, seguido de purificación por GPC.

A finales de la década de los 80, fueron publicados los resultados obtenidos por diferentes laboratorios experimentados, en un estudio comparativo sobre la determinación de PAH en organismos marinos (UTHE y MUSIAL, 1988). Para tal estudio se utilizaron crustaceos, que fueron extraídos con acetona; extracto y residuo, fue analizado por los diferentes laboratorios, usando para ello distintos métodos de extracción y purificación. Los resultados obtenidos, ponen de manifiesto que el 99 % de los PAH estudiados, están presentes en el extracto de acetona obtenido por simple maceración de la muestra, no siendo por tanto necesaria la hidrólisis alcalina de las muestras insolubles (como carnes y pescados) para una completa extracción de estos residuos, como se había sugerido en anteriores estudios (GRIMMER y BÖHNKE, 1975). Aún así, en recientes publicaciones, continúa utilizándose la saponificación para este tipo de muestras.

COCCHIERI y col. en 1990 investigan 16 PAH en organismos marinos en la costa mediterránea de Italia, por HPLC con detector ultravioleta, encontrando una media en mariscos de 217 $\mu\text{g/Kg}$ (en peso húmedo) y en pescados entre 94 y 1930 $\mu\text{g/Kg}$ (en peso húmedo). La recuperación media es del 90 % y los límites de detección varían entre 1 $\mu\text{g/Kg}$ para el antraceno y 20 $\mu\text{g/Kg}$ para el acenaftileno.

LEBO y col. (1991) analiza hidrocarburos aromáticos mono y policíclicos en pescados, por GC-FID. Tras saponificación con potasa, la muestra es extraída con ciclopentano/diclorometano y purificada mediante sílica gel y silicato de potasio, seguido de GPC. PERFETTI y col. (1992) también utilizan un previo tratamiento alcalino de la muestra y partición líquido líquido con 1,1,2-triclorotrifluoroetano.

SHCEKATURINA y col. en 1995, determinan la presencia de PAH carcinógenos en mejillones de las bahías de Sebastopol (crónicamente polucionada) y de Karadag (relativamente limpia) en el mar Negro. El método se basa en una hidrólisis alcalina, seguida de extracción con n-hexano. Los PAH se separan por TLC y se identifican y cuantifican mediante espectrofluorescencia (efecto Shpol'skii). Todos los PAH son encontrados en la bahía polucionada, con una concentración 6-50 veces más alta que en la limpia.

El procedimiento de GRIMMER y BÖHNKE (1975), ya explicado anteriormente, fue muy utilizado para el análisis de PAH en productos vegetales, aunque también se desarrollaron nuevos métodos posteriormente. COATES y col. (1986) compara cuatro procedimientos de extracción para tejidos de plantas: baño ultrasonidos (sonicación), Soxhlet, extracción sólido líquido y extracción en baño. Como solvente de extracción se utilizó el ACN, el cual fue purificado mediante partición líquido-líquido con pentano y paso a través de columnas de ácido micro silícico, analizándose los PAH mediante GC-FID. La sonicación resultó ser el método más conveniente y simple con el que se obtenían porcentajes de recuperación más elevados. Un procedimiento similar, utilizando la sonicación como técnica de extracción, fue usado en 1992 por HECHLER y col., para la separación de PAH en plantas, en este caso usando tetrahidrofurano como solvente de extracción.

WILD y col en 1992 estudian el arrastre desde el suelo de PAH en zanahoria, mediante extracción con diclorometano en soxhlet, concentración bajo corriente de nitrógeno y purificación a través de florisil, elución con diclorometano, concentración y análisis por HPLC con detector de fluorescencia. Las recuperaciones encontradas oscilan entre 80 y 100 % y el límite de detección entre 0.11 y 2.83 $\mu\text{g/Kg}$.

YUCO YABIKU y col. (1993) analizan cincuenta y cinco muestras de aromas de humo y alimentos ahumados para investigar los niveles de PAH, principalmente B(a)P. Para ello utilizan una adaptación del método desarrollado por JOE y col. (1984) para el análisis de alimentos ahumados, ya explicado anteriormente. En el 73 % de las muestras de aroma de humo encontraron B(a)P, en niveles de 0.1 a 336.6 $\mu\text{g/Kg}$, así como en el 52 % de las muestras de ahumados, en concentraciones de 0.1 a 5.9 $\mu\text{g/Kg}$.

SIMKO y col. (1994) realizan un estudio sobrecargando un aroma de humo líquido con una mezcla de PAH de concentración total de 91.1 $\mu\text{g/Kg}$, envasándolo en frascos de polietileno de baja densidad. Mediante HPLC con detección de fluorescencia, siguieron los cambios en los niveles de los PAH durante 164 horas, observándose una disminución de los mismos hasta valores próximos a cero. El método utilizado para tal estudio consiste en, extracción de la muestra con n-hexano tras dilución de la misma con una solución de sosa al 20 % (p/v). El eluato obtenido, tras ser lavado con agua destilada y secado con sulfato sódico anhidro, se concentra a sequedad, y se redissuelve en 3 mL de metanol.

En los últimos años se ha venido observando un creciente interés por los llamados fluidos supercríticos (etileno, dióxido de carbono, etano, óxido nitroso, propileno...) como técnica de extracción. Estos solventes se caracterizan por tener baja viscosidad, tensión superficial prácticamente nula, elevada difusividad y gran poder solvente. Esta combinación de propiedades permite a los fluidos supercríticos penetrar en un material de igual forma que los gases, pero con la diferencia importante de que poseen propiedades solventes similares a las de los líquidos. Todo ello, unido a la posibilidad de modificar selectivamente su capacidad de extracción mediante la presión y la temperatura aplicada al sistema, los convierte en candidatos interesantes para la extracción de muestras (WRIGHT y col., 1989; TANG y col., 1993).

Para algunas extracciones, el poder solvente del fluido utilizado no es suficiente aunque se fijen las condiciones de presión y temperatura adecuadas. En estos casos, se pueden utilizar modificadores (acetona, metanol, cloroformo, etanol, dietilamina, diclorometano, clorobenceno...) consiguiéndose de esta forma combinar el poder solvente del fluido supercrítico de elevada densidad, con la naturaleza polar del modificador añadido. Estos cosolventes modificadores pueden ser incluidos en el proceso de extracción mezclados con el extractante o bien con las muestras. Cada uno de estos procedimientos presenta sus ventajas. Para la elección del modo de adición hay que tener en cuenta el mecanismo modificador, la instrumentación disponible y el coste del fluido (TENA y col., 1994).

La extracción mediante SFE (supercritical fluid extraction) presenta además la ventaja de poder ser utilizada en conexión (*on-line*) con las técnicas cromatográficas, o bien de forma independiente al análisis instrumental posterior (*off-line*), siendo esta última, la forma más comunmente empleada. Ambas posibilidades tienen, no obstante, sus ventajas, que hacen referencia sobre todo, a la sensibilidad y a la exactitud en el primer caso, y a una mayor flexibilidad experimental en el segundo (FURTON y col., 1993).

Recientemente, la aplicación de la extracción mediante fluidos supercríticos para la determinación de PAH en diferentes matrices como suelos, sedimentos y lodos ha sido demostrada (ISCO INC, 1991; PORTER y col., 1992; DANKERS y col., 1993; HILLS, y col., 1993; GERE y col., 1994; REINDL Y HÖFLER, 1994; TENA y col., 1994; BARNABAS y col., 1995; EZZEL, 1995); no habiendo encontrado en la bibliografía ninguna aplicación para la extracción en alimentos.

En un trabajo reciente realizado en este departamento por LAFFON (1996) (dirigida por LAGE y SIMAL), se aplicó la extracción mediante fluidos supercríticos para determinar B(a)P y antraceno en aromas de humo hidrosolubles. Para la preparación de la muestra se toman 4 g de alúmina, y sobre ellos se pesan aproximadamente 2 g de aroma de humo. Se homogeneiza la mezcla removiendo, y se introduce en el vaso de extracción utilizando como modificador 200 μ L de metanol. La muestra fue extraída con CO₂ supercrítico a 256 bares (3717 psi) y un flujo de 1.5 mL/min durante 60 minutos (10 minutos extracción estática y 50 minutos extracción dinámica) siendo la temperatura de la cámara 100 °C. Al final de la extracción el "trap" fue enfriado a 50 °C antes de la elución del B(a)P con n-hexano.

Cabe reseñar, por último, algunas de las conclusiones a las que se ha llegado en un reciente estudio realizado por TENA y col. (1994) en el que se pone de manifiesto la distinta capacidad de extracción que exhiben las técnicas, según se aplican a compuestos que se encuentran presentes de forma natural en las muestras, o a compuestos que han sido añadidos a éstas con objeto de calcular la recuperación.

Las técnicas de sobrecarga habitualmente requieren un solvente orgánico como vehículo para depositar el analito en la matriz, y este solvente puede afectar a la integridad química de la muestra y producir diferentes condiciones de deposición en comparación con los analitos ya presentes en ella. La competición entre moléculas de solvente y analito por los lugares de adsorción presentes en la matriz cuando el analito es

depositado desde una solución líquida, puede impedir recuperaciones elevadas. Se ha propuesto la deposición del analito desde una fase de vapor para eliminar esta competencia.

2. MÉTODOS DE MEDIDA

Los métodos de análisis estudiados para la determinación de PAH en alimentos y aromas de humo son muy variados, recogen muy diversas técnicas y afectan a muy distintas mezclas de hidrocarburos.

Los primeros métodos analíticos utilizados para el análisis de PAH a niveles traza en los alimentos fueron la **espectrometría de absorción UV/Vis** y la **fluorescencia**, con una separación previa mediante cromatografía de papel (PC) (LIJINSKY y SHUBIK, 1964 y 1965) o capa fina (TLC) (HOWARD y col., 1968; MASUDA, 1971; WHITE y col., 1971; SAGREDOS y col., 1981; SHCEKATURINA y col., 1995; POTTHAST Y EIGNER, 1975; ALONGE, 1988).

En comparación a la espectrometría de absorción UV/Vis, la fluorescencia es una técnica menos universal, pero también más sensible (para este tipo de sustancias su sensibilidad es, frecuentemente de 10 a 1000 veces mayor que la de la espectrofotometría de absorción) (MOREL y col., 1991). Mientras que la absorción en el ultravioleta próximo y en el visible, es una propiedad general de los analitos con grupos cromóforos, muchos de estos compuestos son malos fluoróforos, sin embargo, los PAH son los que presentan mayor fluorescencia natural. Una selectividad adicional es también conseguida en la espectrofluorimetría ya que son dos (en vez de una como en las medidas de absorción) las longitudes de onda que se pueden seleccionar para la determinación de un compuesto, longitud de onda de excitación y de emisión. Con respecto a las técnicas cromatográficas, aporta importantes ventajas como son un análisis directo, frente a los 20-45 minutos de una inyección cromatográfica, lo que permite la monitorización de un gran volumen de muestras; un consumo mínimo de reactivos que queda reducido al estrictamente necesario para la preparación de la muestra para el análisis y límites de detección y cuantificación muy bajos, del orden de ng/L e incluso pg/L, que no llegan a alcanzarse con otras técnicas como la cromatografía gaseosa.

De todas formas, estas técnicas presentan limitaciones para el análisis de estos analitos en matrices complejas como son los alimentos y los aromas de humo, debido por una parte a la incapacidad de resolver mezclas complejas de PAH y por otra, a las interferencias provocadas por sustancias que coextraen junto a estos residuos,

provocándose solapamientos entre las bandas espectrales. Este problema puede ser solventado mediante la espectrofluorimetría sincrónica, técnica primeramente utilizada por LLOYD (1971) que ha experimentado en los últimos años grandes avances dadas las múltiples posibilidades que ofrece.

Además de una mayor selectividad, inferida por la posibilidad de poder variar ambas longitudes de onda durante el análisis, la espectrofluorimetría sincrónica permite, respecto a la convencional, reducir la complejidad espectral, los anchos de banda espectrales con el consiguiente aumento de resolución, y las interferencias Rayleigh scatter (ANDRE y col., 1977 (a y b); ANDRE y col., 1979; INMAN y col., 1982 (a); BAUDOT y col., 1991), sin que ello afecte a la sensibilidad.

La primera de las modalidades sincrónicas descritas, y la más comunmente usada, es la de la **espectrofluorimetría sincrónica a intervalos de longitud de onda constante** (LLOYD, 1971), en la que el espectro de fluorescencia se obtiene manteniendo constante la diferencia entre las longitudes de onda de excitación y de emisión (VODINH y col., 1978; ABBOTT y col., 1986; BAUDOT y col., 1991).

Otra modalidad es la **espectrofluorimetría sincrónica a intervalos de energía constante** en la que lo que se mantiene invariable es la diferencia de energía entre ambas longitudes de onda. Esta técnica desarrollada por INMAN y col. en 1982 (a y b), ha sido mucho menos utilizada que la anterior (ANDRE y col., 1986; FILES y col., 1986; LI y col., 1992), posiblemente por razones instrumentales (CABANNIS, 1987).

Para incrementar la selectividad de los procedimientos sincrónicos ordinarios se ha propuesto la combinación de los mismos con la técnica de derivadas. El principal efecto que se consigue es una intensificación de las bandas agudas y una apreciable disminución o desaparición de las anchas, aunque eso lleve consigo también un incremento del ruido de fondo (SALGADO y col., 1986). Esta técnica ha sido utilizada con frecuencia en el análisis de multicomponentes orgánicos (GUTIERREZ y col., 1987; IZQUIERDO y col., 1990; MUÑOZ DE LA PEÑA y col., 1991).

Cabe señalar, que la mayor parte de los artículos publicados sobre la determinación de PAH mediante la espectrofluorimetría sincrónica en sus diversas modalidades como técnica de análisis básica, se encuentra aplicados a muy diversas matrices y combinaciones de PAH (LAW y ANDRULEWICZ, 1983; GARCÍA Y POSSIDONI, 1987; TANAKA y col., 1987; TANAKA y SAITO, 1988; ZHENHUA y WENYI, 1989; SANTANA y col., 1993; LÓPEZ DE ALDA y col., 1995 a, b y 1996;

SIMAL y col., 1992), no habiéndose encontrado en la bibliografía manejada, ninguna aplicación a alimentos ni aromas de humo.

Con la introducción de la cromatografía de gases y líquida, las metodologías se simplificaron, realizándose el análisis de manera más rápida y sencilla, ganando también en sensibilidad y/o especificidad gracias al desarrollo de nuevos sistemas de detección.

La gran capacidad de resolución que presenta la **cromatografía de gases**, ha hecho que haya sido durante mucho tiempo la técnica de elección para análisis de mezclas de hidrocarburos aromáticos policíclicos, utilizando como sistemas de detección, el **FID** (GRIMMER Y BONKE, 1975; FRETHERM, 1976; SAITO, 1978; VASSILAROS, 1982a; COATES y ELZERMAN, (1986); BIRKHOLZ, 1988; UTHE y MUSIAL, 1988; VAESSEN y col, 1990; MENICHINI y col., 1991 a y b; MOTHERSHEAD y HALE, 1992; NOLL y TOLEDO, 1995) o **MS** (VASSILAROS, 1982a; SPEER y col., 1990 b; VREULS y col., 1991; WISE y col., 1991; AL-YAKOOB y col., 1994).

En los años 70 surge la **cromatografía líquida de alta resolución**, no dejando desde entonces de ser utilizada para la separación y aislamiento de estos residuos debido a su alta eficiencia, facilidad de automatización, y posibilidad de utilizar en una fase posterior otras técnicas de análisis, incluyendo la cromatografía gaseosa y la espectrometría UV/Vis (JOE y col., 1984; COCCHIERI y col., 1990), aunque la mayor selectividad y sensibilidad se consigue con la detección mediante **FL**, utilizando longitudes de onda de excitación y emisión específicas (DENNIS y col., 1984; TAKATSUKI y col., 1985; WILD y JONES, 1991, 1992; WISE y col., 1991; PERFETTI y col., 1992; SAINT-AUBERT y col., 1992; ALPENDURADA, 1993; FURTON y JOLLY, 1993; ; GOMAA y col, 1993; SETO y col., 1993; YUCO YABIKU y col., 1993; AKPAN, 1994; SIMKO y col., 1994; MÄKELA y PYY, 1995).

Por ello, esta técnica de **HPLC** con detección **UV** y/o **FL** es la propuesta en diferentes métodos oficiales para análisis de PAH:

- El método apuntado en la sección 6440 de la APHA (1992), aprobado igualmente en 1987 por el Standard Methods Committee y aceptado por la USEPA como equivalente al Método 610 de la EPA, apunta dos posibles técnicas para el análisis de 16 PAH: una basada en la cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama (Método 610d de la EPA), para el que no se han reportado límites de detección; y otra basada en la cromatografía líquida de alta resolución con detectores de UV y FL

(Método 610 de la EPA), con la que se consiguen límites de detección mejores que los del método gas-cromatográfico anterior, que oscilan entre 17 y 210 ng/L, para el benzo(k)fluoranteno y el fluoranteno respectivamente.

- El procedimiento propuesto, a su vez, por el ASTM (1989) para la determinación de los mismos compuestos en aguas (incluyendo aguas superficiales y potables) coincide básicamente con el anteriormente descrito método 610 de la EPA.

- Para aguas potables, el método 550.1 de la USEPA, se basa también en la cromatografía líquida de alta resolución con detectores de UV y fluorescencia, bien por la inyección directa de la muestra filtrada o mediante el uso previo de discos de extracción en fase sólida (PERKIN ELMER, 1993).



OBJETIVO



OBJETIVO

El objetivo de este trabajo consistió en poner a punto un método basado en la cromatografía líquida de alta resolución y en la espectrofluorimetría, que permita sobre las bases de la rutina, realizar un estudio sistemático de la presencia de B(a)P en alimentos ahumados y en aromas de humo.

Debido a la complejidad de las muestras, las etapas de extracción y de purificación, así como la sensibilidad de las técnicas analíticas, son fundamentales para poder alcanzar los niveles traza a los que se encuentra dicho analito.

El B(a)P, compuesto de reconocida actividad carcinogénica, se establece como representante del grupo de los PAH, considerando que cuando éste está presente lo están también otros compuestos de la misma familia, igualmente con posible actividad mutagénica. De ahí que la legislación establezca un máximo para los PAH expresado en B(a)P, y situado en 0.03 $\mu\text{g/Kg}$ para los alimentos adicionados de aroma de humo, y en 10 $\mu\text{g/Kg}$ para los aromas de humo, mientras que para los alimentos ahumados de forma tradicional no existe actualmente ningún límite.

PARTE EXPERIMENTAL



Para la redacción de la memoria y para la realización de las gráficas se utilizó un ordenador IBM 2133-911 (CPU: 25 MHz, RAM: 2 MB y disco duro: 85 MB), con el sistema operativo MS-DOS versión 5.00, y entorno Windows versión 3.1, provisto de los softwares MICROSOFT WORD (versiones 2.0 y 6.0), CHEM WINDOW (versión 3.0), HARVARD GRAPHICS (versión 3.0), y STATGRAPHICS (versión 2.6).

3. REACTIVOS

(a) Benzo(a)pireno ALDRICH, CAS NO. 50-32-8 (referencia, F-73)

(Precaución: Este compuesto es un probable carcinógeno, por lo que deben tenerse en cuenta una serie de precauciones en su manejo. Ver ficha técnica y precauciones específicas en paginas 31-33)

(b) Minicolumnas Sep Pak C-18 Plus y Sílica Plus de WATERS

(c) Agua de grado HPLC, obtenida por ósmosis en un equipo MILLI-Q Plus, MILLIPORE.

(d) Acetona para análisis, MERCK (referencia, 100014)

(e) Acetonitrilo (ACN) grado HPLC, SCHARLAU (referencia, ACN-45)

(f) Benceno, NORMASOLV (referencia, Nv060)

(g) Cloroformo, ANALAR (referencia, UN1888)

(h) Cloruro sódico para análisis, MERCK (referencia, 106404)

(i) Diclorometano para análisis de trazas orgánicas, MERCK (referencia, 106054)

(j) Dimetilsulfóxido (DMSO) para análisis, PANREAC (referencia, 131954)

(k) Metanol grado HPLC, SCHARLAU (referencia, ME-306)

(l) N-hexano para análisis de trazas orgánicas, MERCK (referencia, 104371)

(m) Tolueno, NORMASOLV (referencia, Nv211)

(n) Nitrógeno de la SEO N-45

(ñ) Helio de la SEO N-50

La pureza de los reactivos ha sido chequeada previamente a su uso, mediante la realización de blancos en las condiciones de análisis.

4. PREPARACIÓN DE LOS PATRONES

Las soluciones madre de B(a)P de concentraciones 100 mg/L y 100 µg/L, fueron preparadas en n-hexano y se mantuvieron refrigeradas a 4 °C en probetas de vidrio recubiertas con papel de aluminio, para evitar posibles degradaciones por acción de la luz. A partir de éstas, se prepararon las soluciones de trabajo de B(a)P en acetona, acetonitrilo, benceno, cloroformo, diclorometano, DMSO, metanol, n-hexano y tolueno. En n-hexano, se obtuvieron por la apropiada dilución de la solución madre. En los demás solventes, tomando el volumen necesario de B(a)P en n-hexano, evaporando a sequedad bajo corriente de nitrógeno y redisolviendo en cada uno de ellos.

DETERMINACIÓN DE BENZO(A)PIRENO EN ALIMENTOS AHUMADOS MEDIANTE HPLC-FL



1. PROTOCOLO ANALÍTICO

1.1. DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS

Se han analizado muestras de distintos alimentos ahumados, naturales y/o con aditivos de humo, fundamentalmente derivados cárnicos y pescados de venta y consumo en nuestro país, cuya relación y características indicadas en el etiquetado se encuentran recogidas en la Tabla VI.

1.2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

El contenido de cada envase se homogeneiza, se pasa a una cápsula de vidrio y se somete a liofilización (0.01 mm de Hg durante 2 ó 3 días; temperaturas de - 40 °C a + 30 °C). Una vez secas, las muestras se pulverizan finamente con un molinillo, y son almacenadas a temperatura ambiente en frascos de cristal protegidas de la luz. Si la muestra no puede ser liofilizada inmediatamente, se congela y se mantiene a -22 °C hasta el momento de la liofilización.

1.3. PROCEDIMIENTO (Figura 10) (GARCÍA FALCÓN y col., 1996 a)

1.3.1. EXTRACCIÓN

5 g de muestra liofilizada se macera tres veces en baño ultrasonidos con 25, 15 y 10 mL de n-hexano, durante un tiempo de 1 hora cada extracción.

El extracto recogido, aproximadamente 50 mL, se centrifuga durante 10 minutos a 2500 rpm, separando la capa sobrenadante con pipeta para evitar arrastre del residuo. Se lavan las paredes del tubo de centrifuga con n-hexano y se centrifuga de nuevo 5 minutos. La capa sobrenadante se une a la anterior.

El extracto obtenido se evapora a sequedad en baño María a 35 °C bajo corriente de nitrógeno, redisolviendo posteriormente el residuo en 5 mL de n-hexano.

1.3.2. PURIFICACIÓN

Los 5 mL de la disolución de n-hexano se pasan a través de una minicolumna Sep Pak de Sílica Plus, eluyéndose con 10 mL más de n-hexano.

Tabla VI- Características de las muestras de alimentos analizadas

Nº de muestra	Producto	Envasado	Ahumado
1	Jamón cocido	A granel	Extracto
2	Paleta cocida	A granel	Extracto
3	Paleta cocida	A granel	Extracto
4	salchicha cocida	Plastico a vacío	Extracto
5	Salchicha cocida <i>frankfurt</i>	Plastico a vacío	Extracto
6	Salchicha cocida <i>frankfurt</i>	Plastico a vacío	Extracto
7	Salchicha <i>frankfurt</i>	Plastico a vacío	Ahumada
8	Salchicha <i>frankfurt</i>	Plastico a vacío	Ahumada
9	Salchicha <i>frankfurt</i>	Plastico a vacío	Humo natural
10	Salchicha <i>frankfurt</i>	Plastico a vacío	Humo natural
11	Salchicha <i>frankfurt</i> bacon-queso	Plastico a vacío	Ahumada
12	Salchicha <i>frankfurt</i> chorizo	Plastico a vacío	Ahumada
13	Salchicha <i>viena</i>	Plastico a vacío	Ahumada
14	Salchicha <i>viena</i> bacon queso	Plastico a vacío	Ahumada
15	Salchichas aperitivo	Tarro de cristal	Humo
16	Salchichas aperitivo	Plastico a vacío	Humo natural
17	Salchichas parmesán	Plastico a vacío	Ahumada
18	Salchichas <i>snackis</i>	Plastico a vacío	Humo natural
19	Bacon	A granel	Ahumado
20	Chorizo	A granel	Ahumado
21	Chorizo	A granel	Ahumado
22	Lomo	Plastico a vacío	Humo natural de leña de roble
23	Mortadela <i>Boloñesa</i>	A granel	Humo natural
24	Queso ahumado	A granel	Ahumado
25	Queso ahumado con <i>jamón</i>	A granel	Ahumado
26	Queso ahumado con <i>jamón</i>	Enlatado	Ahumado

Tabla VI.- Características de las muestras analizadas (continúa)

Nº de muestra	Producto	Envasado	Ahumado
27	Patatas barbacoa	Bolsa de aluminio	Sabor a carne ahumada
28	Anchoa	Plástico a vacío	Humo de madera de haya
29	Anchoa	Plástico a vacío	Humo natural
30	Arenque	A granel	Humo natural
31	Arenque	Plástico a vacío	Humo de madera de haya
32	Arenque fileteado	Plástico a vacío	Humo de madera de haya
33	Atún en lonchas	A granel	Humo natural
34	Atún en lonchas	Plástico a vacío	Humo de madera de haya
35	Atún en lonchas	Plástico a vacío	Humo de maderas nobles
36	Bacalao en lonchas	Plástico a vacío	Humo natural
37	Caballa	Plástico a vacío	Humo de maderas nobles
38	Caballa	Plástico a vacío	Humo de laurel
39	Palometa en lonchas	Plástico a vacío	Humo de madera de haya
40	Palometa en lonchas	Plástico a vacío	Humo de maderas nobles
41	Pez espada en lonchas	Plástico a vacío	Humo de madera de haya
42	Pez espada en lonchas	A granel	Humo natural
43	Salmón en aceite enlatado	Enlatado	Ahumado con madera de haya
44	Salmón en lonchas	Plástico a vacío	Humo natural
45	Salmón en lonchas	A granel	Humo natural
46	Salmón en lonchas	Plástico a vacío	Humo de maderas nobles
47	Paté de salmón	Plástico	Salmón ahumado
48	Sardina	Plástico a vacío	Humo de laurel
49	Trucha en lonchas	Plástico a vacío	Humo de madera de haya
50	Trucha en lonchas	Plástico a vacío	Humo natural
51	Trucha en lonchas	Plástico a vacío	Humo de madera de haya

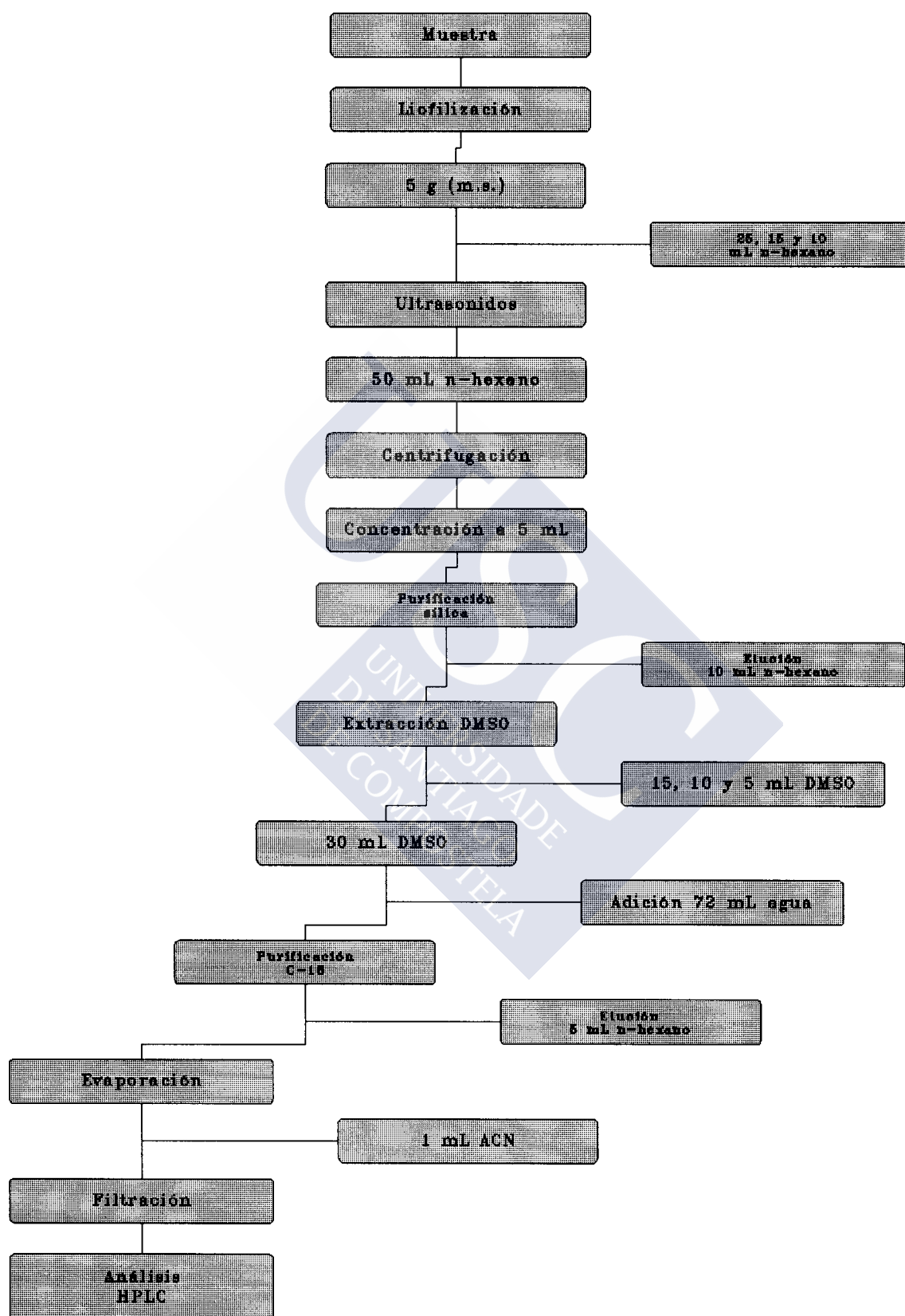


Figura 10.- Esquema del método utilizado para el análisis de benzo(a)pireno en alimentos ahumados

El eluato de n-hexano recogido (15 mL) es extraído a continuación con dimetilsulfóxido, (previamente saturado con n-hexano) con el fin de separar el benzo(a)pireno, de la grasa existente. Para ello se realizan tres extracciones en ampolla de separación durante 5 minutos cada una, con 15, 10 y 5 mL de DMSO. Si hay formación de emulsiones, éstas se rompen por adición de solución de cloruro sódico al 2 % (p/v). El extracto de aproximadamente 30 mL de dimetilsulfóxido obtenido se lava con 10 mL de n-hexano.

La solución de DMSO fue diluida con 72 mL de agua MILLI-Q y pasada a través de una minicolumna Sep Pak Plus C-18 (previamente activada con 5 mL de ACN seguidos de 10 mL de agua MILLI-Q) con el fin de purificar y concentrar el extracto. Las paredes del recipiente que contiene la solución, fueron lavadas con 10 mL de agua y pasadas también por la minicolumna. La Sep-pak C-18, en la que está retenido el B(a)P, se seca bajo corriente de nitrógeno, eluyéndose el analito con 5 mL de n-hexano.

Este eluato fue finalmente concentrado a sequedad bajo corriente de nitrógeno, y redisoluto en 1 mL de ACN, que tras ser filtrado (filtros MFS-25, con tamaño de poro 0.5 μ m) fue analizado por HPLC-FL.

1.3.3. ANÁLISIS

1.3.3.1. ESPECTROFLUORIMETRÍA

Para la optimización de las diferentes etapas de purificación se utilizó el método espectrofluorimétrico con aplicación de segunda derivada puesto a punto por LOPEZ de ALDA y col. (1995 a y b), con las siguientes condiciones de trabajo:

- rango espectral ($\lambda_{exc.}$): 200-500 nm
- rendija de excitación: 5 nm
- rendija de emisión: 5 nm
- velocidad de barrido: 240 nm/minuto
- intervalo de longitud de onda ($\Delta\lambda$): 110 nm

La segunda derivada, se obtiene mediante la aplicación del software FLUORESCENCE DATA MANAGER, utilizando el factor 2/9. Para la cuantificación, se utiliza la distancia máximo-mínimo, en unidades de intensidad, entre 290-296 nm.

1.3.3.2. HPLC-FL

Una alícuota (20 μ L) de la solución de ACN, fue inyectada en HPLC utilizando como fase móvil ACN-agua (85:15) a flujo constante de 0.5 mL/min.

Para la cuantificación del B(a)P se utilizaron longitudes de onda de excitación ($\lambda_{exc.}$) y de emisión ($\lambda_{em.}$), de 296 y 406 nm respectivamente, y un "range" de 0.05. La temperatura de la columna se mantuvo a 38 °C.

1.3.4. CONFIRMACIÓN DE RESULTADOS

La presencia de B(a)P, identificado mediante HPLC-FL con longitudes de onda de excitación y emisión 296 y 406 nm respectivamente, fue confirmado de las siguientes formas:

1) Por HPLC-FL, en idénticas condiciones de trabajo, pero con las longitudes de onda de 296 nm para la excitación y 426 nm para la emisión, ya que en estas condiciones la señal del benzo(a)pireno presenta una intensidad menor que con las longitudes de onda utilizadas para la cuantificación (Figura 1).

2) Mediante la realización en HPLC-FL de espectros de emisión y espectros en modo sincron sobre el pico que eluye, sin parar el barrido. Las condiciones de trabajo usadas fueron:

- Espectros de emisión: longitud de onda de excitación: 296 nm; inicio de la longitud de onda de emisión: 350 nm; rango espectral: 100 nm; intervalo de lectura: 2 nm.

- Espectros sincron ($\Delta\lambda$:110 nm): inicio de la longitud de onda de excitación: 250 nm; inicio de la longitud de onda de emisión: 360 nm; rango espectral: 100 nm; intervalo de lectura: 2 nm.

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1. EXTRACCIÓN

El marcado carácter lipofílico de los PAH hace que estos compuestos se acumulen mayoritariamente en la grasa de los alimentos, por ello, y con el fin de facilitar

su separación de estos componentes lipídicos, inicialmente se pensó en someter las muestras a saponificación con potasa, de acuerdo con el método propuesto por distintos investigadores (DENNIS y col., 1984; TAKATSUKI y col. 1985; SPEER y col. 1990 b; LEBO y col. 1991; PERFETTI y col. 1992; SETO y col. 1993; SHCEKATURINA y col., 1995). Sin embargo, después de varias pruebas realizadas con muestras sobrecargadas, la formación de emulsiones al extraer posteriormente con n-hexano, daban lugar a pérdidas importantes, lo que hizo que este método fuera desechado.

Se pasó entonces a la extracción de la grasa directamente de la muestra, dónde están depositados los PAH. Para ello se procedió previamente al desecado de la misma por liofilización, ya que el secado en estufa a temperaturas próximas a 100 °C produce una disgregación de la grasa y no permite tomar una alicuota homogénea representativa de la muestra.

Como técnica de extracción se eligió la sonicación, ya utilizada para la obtención de PAH de diferentes matrices como plantas, suelos, sedimentos, corales... (COATES y ELZERMAN, 1986; MORSELLI y ZAPPOLI, 1988; HECHLER y col., 1995; AAMOT y col., 1996; READMAN y col., 1996), no habiéndose encontrado sin embargo en la bibliografía ninguna referencia a su aplicación sobre alimentos.

Esta técnica permite extraer la grasa y los PAH conjuntamente en menos tiempo (3 horas) que mediante el método tradicional del soxhlet, que es utilizado, entre otros, por BIRKHOLZ (1988), WILD y JONES (1991) y MOTHERSHEAD y col. (1992), para analizar tejidos de pescado, zanahorias y cangrejos, mediante extracción con diclorometano durante 7, 6 y 48 horas respectivamente; por su parte BRAVO y SALAZAR (1978) extraen ostras durante 12 horas con ciclohexano.

Como solvente se eligió el n-hexano por las siguientes razones:

- Es uno de los solventes más utilizados para la extracción de compuestos orgánicos (entre ellos los PAH) a partir de diferentes matrices (GUILLÉN, 1994).
- Es el recomendado por las legislaciones europea y española para la determinación de PAH en aguas (Directiva del Consejo 80/778/CEE, Real Decreto 1138/1990).
- Ha sido utilizado por nosotros en un proyecto realizado con la Consellería de Sanidade de la Xunta de Galicia, para el análisis de PAH en aguas por

espectrofluorimetría sincrónica, con un porcentaje de recuperación del 94 % (LÓPEZ DE ALDA y col., 1995 b).

- Sus características espectrofluorimétricas, libres de interferencias tipo Raman básicamente permiten tener una amplia zona dónde es posible detectar y cuantificar de manera precisa el benzo(a)pireno (LÓPEZ DE ALDA y col., 1994 a).

En nuestro trabajo, la muestra liofilizada, fue entonces sometida a extracción por ultrasonidos con n-hexano, realizándose tres particiones sucesivas con 25, 15 y 10 mL, durante una hora cada una. Para facilitar la posterior separación de solvente y residuo, la muestra liofilizada fue finamente pulverizada e introducida en bolsitas elaboradas con papel de filtro (Figura 11).

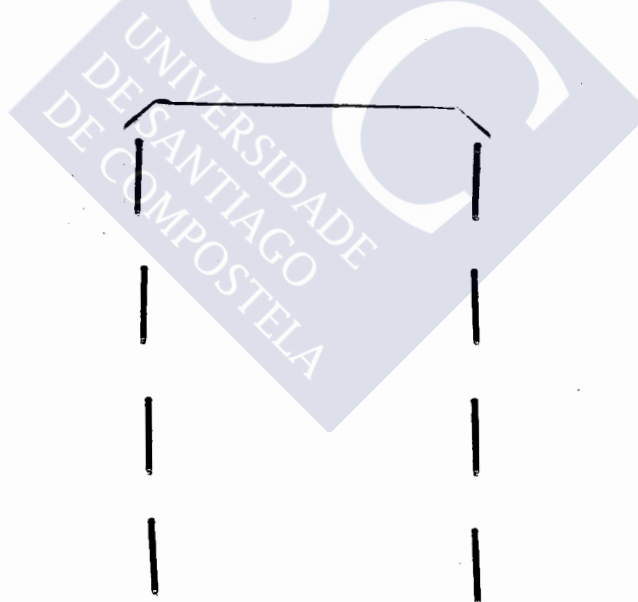


Figura 11.- Envases de papel de filtro utilizados para la extracción de las muestras de alimentos

2.2. PURIFICACIÓN

El eluato hexánico obtenido se ha sometido a varias etapas de purificación y concentración con el fin de poder llegar a detectar los niveles de benzo(a)pireno requeridos por la legislación (0.03 µg/Kg). Esto incluye:

- Paso a través de minicolumnas Sep Pak de sílica Plus, y elución con n-hexano
- Extracción del n-hexano con dimetilsulfóxido
- Dilución del dimetilsulfóxido con agua y paso por minicolumna Sep Pak C-18 Plus y, elución con n-hexano
- Evaporación a sequedad con nitrógeno

En la optimización de cada una de estas etapas, se ha utilizado la espectrofluorimetría sincrónica ($\Delta\lambda=110$ nm) para la determinación del B(a)P. Este método, aunque da lugar a precisiones (RSD) más elevados que los obtenidos por cromatografía, es mucho más rápido y los resultados son igualmente satisfactorios.

El principal objetivo de la purificación va a ser separar los compuestos grasos, del analito objeto de estudio, ya que representan una gran interferencia en el tipo de muestras analizadas. Para ello se efectuaron diferentes ensayos:

- Centrifugación tras haber sometido el extracto hexánico a bajas temperaturas (- 22 °C). Al mantener el extracto durante aproximadamente media hora en estas condiciones, la grasa se solidifica y sedimenta, pudiendo ser separadas posteriormente por centrifugación. Pero, al realizar la experiencia con patrones de B(a)P, se observó que el analito tenía más afinidad por el material lipídico que por el n-hexano, debiendo por ello desechar este método.

- Purificación del extracto mediante minicolumnas Sep Pak Florisil Plus: Se estudió por separado el comportamiento de patrones de B(a)P en n-hexano y de grasa en n-hexano, cuando eran pasados a través de estos cartuchos. Se observó que el B(a)P quedaba fuertemente retenido, pudiendo ser eluido posteriormente con una mezcla de n-hexano/eter 85:15 (10 mL). Por otra parte, los componentes lipídicos no quedaban retenidos por la minicolumna, sino que eran eluidos con el n-hexano; pudiendo ser factible, por tanto, la separación de ambos componentes. Sin embargo al realizar la

- Extracción del residuo graso con ACN mediante sonicación, tras eliminar el n-hexano bajo corriente de nitrógeno: aparte de la dificultad para separar posteriormente las dos fases, los porcentajes de recuperación fueron igualmente insuficientes, debido de nuevo, a la mayor afinidad del B(a)P por los lípidos que por el ACN.

- Finalmente, se ensayó la partición líquido-líquido del extracto hexánico con dimetilsulfóxido, solvente ya utilizado por otros autores (JOE y col., 1984; MENICHINI y col. 1991 a y b) y por el que los PAH presentan mayor afinidad; permitiendo de forma satisfactoria separar el benzo(a)pireno de los componentes grasos, que quedan retenidos por el n-hexano. Debido a la formación de grandes emulsiones difíciles de romper cuando se extrae directamente la muestra disuelta en hexano después de la centrifugación, fue necesaria una previa purificación a través de minicolumnas Sep Pak de sílica.

2.2.1. PURIFICACIÓN MEDIANTE SEP PAK DE SÍLICA PLUS

El extracto de n-hexano concentrado a 5 mL obtenido tras la centrifugación, se pasa por minicolumna Sep Pak de sílica Plus para la purificación de alguno de los compuestos grasos presentes en las muestras. La elución del B(a)P se completa con 10 mL adicionales de n-hexano.

Para la optimización del volumen de n-hexano necesario para arrastrar todo el benzo(a)pireno de la minicolumna, se hicieron ensayos pasando 5 mL de una solución patrón de 8 µg/L, y eluyendo con distintos volúmenes crecientes de n-hexano (Figura 12).

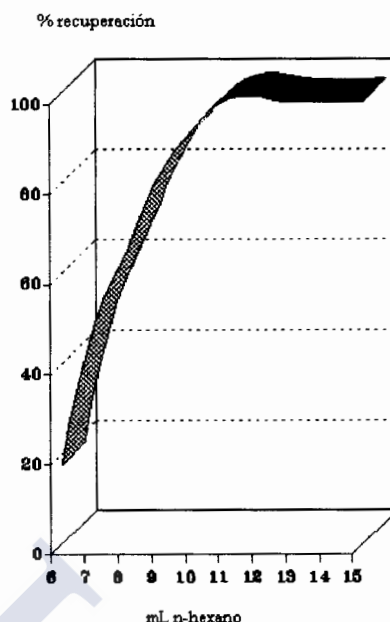


Figura 12.- Optimización del volumen de n-hexano necesario para la elución del benzo(a)pireno retenido en la minicolumna Sep-pak sílica Plus

Como se observa en la figura, a partir de 6 mL la recuperación ya es satisfactoria, aunque se decidió usar un volumen de 10 mL para mayor seguridad.

Una vez fijado el volumen de eluyente en 10 mL (obteniendo un volumen final de 15 mL), se hicieron ensayos variando la concentración de patrón y, repitiendo cada ensayo 6 veces (TABLA VII).

Tabla VII.- RSD y % R obtenidos en la elución con n-hexano de diferentes cantidades de benzo(a)pireno retenidas en la minicolumna Sep-pack sílica Plus al repetir cada ensayo por sextuplicado

Patrón (ng)	X encontrada (ng)	Precisión (RSD)	Recuperación (%R)
5.0	5.0	5.3	100
20.0	19.5	4.1	97.3

2.2.2. EXTRACCIÓN DEL N-HEXANO CON DIMETILSULFÓXIDO

La partición líquido-líquido del extracto hexánico con 15, 10 y 5 mL de DMSO, solvente por el que los PAH presentan mayor afinidad, permite la eliminación de los compuestos grasos no eliminados en el procedimiento anterior.

La disolución al 2 % (p/v) de cloruro sódico permite romper las emulsiones en caso de que se presenten. A lo largo de los experimentos realizados se ha observado que la aparición de estas emulsiones está en relación directa con el tiempo transcurrido desde la liofilización de la muestra, hasta la extracción de la misma.

Para el estudio de la recuperación del B(a)P en n-hexano con DMSO, se utilizaron soluciones patrón del analito, siendo extraídas con 15, 10 y 5 mL de DMSO durante 5 minutos cada una (TABLA VIII).

Tabla VIII.- RSD y % R obtenidos en el estudio de la extracción de diferentes cantidades de benzo(a)pireno en n-hexano con dimetilsulfóxido al repetir cada ensayo por sextuplicado

B(a)P/n-hexano (ng)	B(a)P/DMSO (ng)	Precisión (RSD)	Recuperación (%R)
10.0	10.1	2.2	101
30.0	29.6	1.2	99

Se observó que la recuperación del B(a)P era también satisfactoria disminuyendo los volúmenes de DMSO (5, 3 y 2 mL), sin embargo estos volúmenes tan pequeños, facilitan la formación de emulsiones, sobre todo con muestras muy grasas.

2.2.3. PURIFICACIÓN MEDIANTE SEP PAK C18 PLUS

El empleo de la minicolumna C-18 para la eliminación de sustancias polares, consigue simultáneamente la purificación y concentración del extracto obtenido, para poder llegar a determinar los niveles de benzo(a)pireno establecidos en la legislación.

Al extracto de dimetilsulfóxido debe añadirse agua para modificar su polaridad y asegurar que todo el benzo(a)pireno quede retenido en la columna, ya que se comprobó que al pasar directamente el extracto por la C-18 activada, ésta, no retiene el analito.

Se hicieron ensayos añadiendo volúmenes crecientes de agua MILLI-Q a 30 mL de una solución patrón de 4 µg/L de benzo(a)pireno en DMSO (Figura 13), hasta conseguir que todo el analito quedase retenido en la minicolumna, estableciéndose finalmente que la proporción en la que el dimetilsulfóxido y el agua deben ser mezclados, es 1:2.4; es decir que a los 30 mL de DMSO obtenidos, se deben añadir 72 mL de agua.

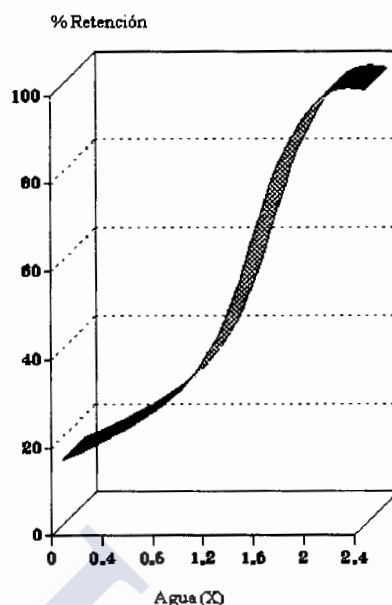


Figura 13.- Optimización de la proporción DMSO:agua (X), para la retención del benzo(a)pireno en la minicolumna Sep-pak C-18

Así, los aproximadamente 102 mL de solución acuosa de dimetilsulfóxido, son pasados por la C-18 quedando retenido todo el B(a)P existente en la muestra. Para facilitar y agilizar este paso, a la minicolumna conectada a una jeringa de vidrio de 100 mL, se le aplicó vacío, controlando la velocidad de flujo con la intensidad de la corriente de agua (Figura 14).

Como solvente de elución se eligió el n-hexano por tener una apolaridad adecuada que permite arrastrar con tan solo 5 mL la totalidad el B(a)P retenido (Figura 15). En la Tabla IX se recogen las precisiones (RSD) y las recuperaciones (% R) obtenidas cuando se utilizan 5 mL para la elución de diferentes cantidades de benzo(a)pireno adsorbidas en una de estas minicolumnas.

Tabla IX.- RSD y % R obtenidos en la elución con n-hexano de diferentes cantidades de benzo(a)pireno retenidas en la minicolumna Sep-pack C-18 Plus al repetir cada ensayo por sextuplicado

Patrón (ng)	Cantidad encontrada (ng)	Precisión (RSD)	Recuperación (%R)
5.0	5.3	2.6	106
20.0	20.8	1.8	104
40.0	36.9	0.6	92

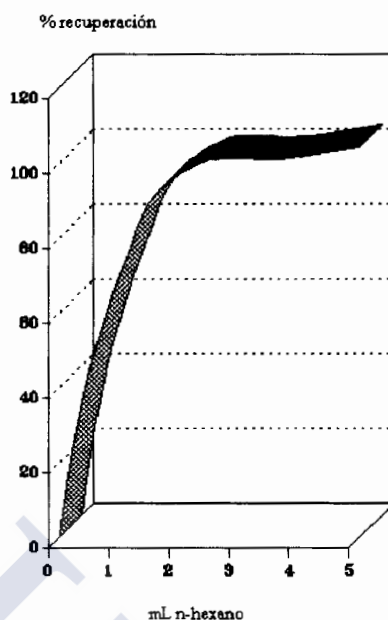


Figura 15.- Optimización del volumen de n-hexano necesario para la elución del benzo(a)pireno retenido en la minicolumna Sep-pak C-18

2.3. ANÁLISIS

2.3.1. ESPECTROFLUORIMETRÍA

La espectrofluorimetría se ha utilizado para la puesta a punto de las distintas etapas de purificación por ser una técnica rápida y fiable, utilizada anteriormente por nosotros para la valoración de diferentes PAH (LOPEZ DE ALDA y col., 1995 a y b).

El espectro sincrónico correspondiente al $\Delta\lambda$ 110 nm es el que presenta el rango espectral de longitudes de onda de excitación más adecuado para la identificación del B(a)P. Se ha seleccionado la utilización de la 2ª derivada porque conduce a una mayor selectividad y resolución de los picos, facilitando de esta forma la cuantificación del analito (Figura 16). La concentración de benzo(a)pireno se determina por la distancia entre máximo (290 nm) y mínimo (296 nm) en el espectro de 2ª derivada, a partir de la recta de calibrado obtenida.

Siguiendo las recomendaciones de la ACS (American Chemical Society) (1980), los límites de detección (LD) y cuantificación (LQ) en unidades de intensidad relativa (UF), se han calculado sumando a la media de 10 blancos de n-hexano, en las condiciones espectrofluorimétricas previamente seleccionadas, tres y diez veces, respectivamente, la desviación estándar de los mismos:

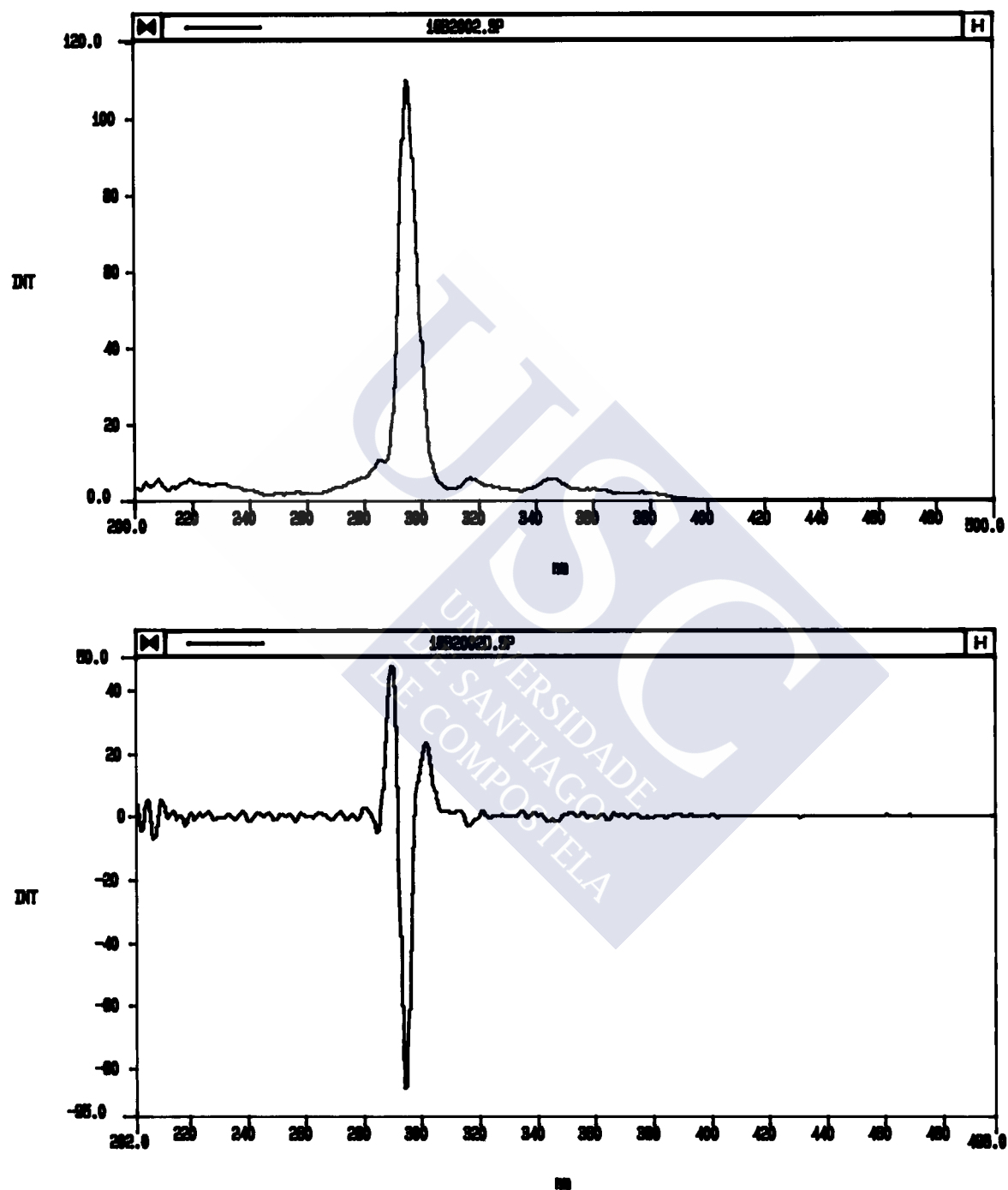


Figura 16.- Espectro de fluorescencia sincrónico de benzo(a)pireno en n-hexano y su segunda derivada ($\Delta\lambda$ 110 nm)

Tabla X.- Límites de detección (LD) y cuantificación (LQ) del benzo(a)pireno en n-hexano obtenidos por espectrofluorimetría sincrónica ($\Delta\lambda$ 110 nm) con aplicación de segunda derivada

\bar{X}_{blanco} (UF)	SD (UF)	LD (UF)	LQ (UF)	LD ($\mu\text{g/L}$)	LQ ($\mu\text{g/L}$)
0.61	0.21	1.24	2.71	0.19	0.41

Una vez conocido el límite de cuantificación en UF, se obtuvo la recta de calibrado por análisis de regresión de las concentraciones 1, 2, 4, 8 y 16 μg de benzo(a)pireno por Litro de n-hexano, medidas por triplicado, frente a las distancias entre máximo y mínimo en el espectro de 2ª derivada (Tabla XI) (ACS, 1980). Pudiendo concluir que la recta encontrada es lineal en el rango de las concentraciones experimentales utilizadas, tal y como se demuestra en la figura 17.

Tabla XI.- Recta de calibrado del benzo(a)pireno en n-hexano obtenida por espectrofluorimetría sincrónica ($\Delta\lambda$ 110 nm) con aplicación de segunda derivada

Rango ($\mu\text{g/L}$)	$\Delta\lambda$ (nm)	λ max, min (nm)	Recta de calibrado	r
1-16	110	290-296	UF = 6.63 [] + 0.3088	0.9992

Conocida la recta de calibrado, se calcularon los límites de detección y de cuantificación del B(a)P en unidades de concentración ($\mu\text{g/L}$), siendo 0.19 y 0.41 $\mu\text{g/L}$ respectivamente (Tabla X).

2.3.2. HPLC-FL

La técnica de HPLC, con mayor resolución y sensibilidad que la espectrofluorimetría, ha permitido alcanzar el límite de cuantificación requerido por la legislación (0.03 $\mu\text{g/Kg}$), y ha sido utilizada para el análisis del benzo(a)pireno en las muestras.

Las longitudes de excitación (296 nm) y de emisión (406 nm) seleccionadas, corresponden a los máximos de excitación y emisión del benzo(a)pireno (Figura 1).

El valor del rango utilizado ha sido de 0.05, por presentar una relación señal/ruido conveniente para las concentraciones de trabajo utilizadas.

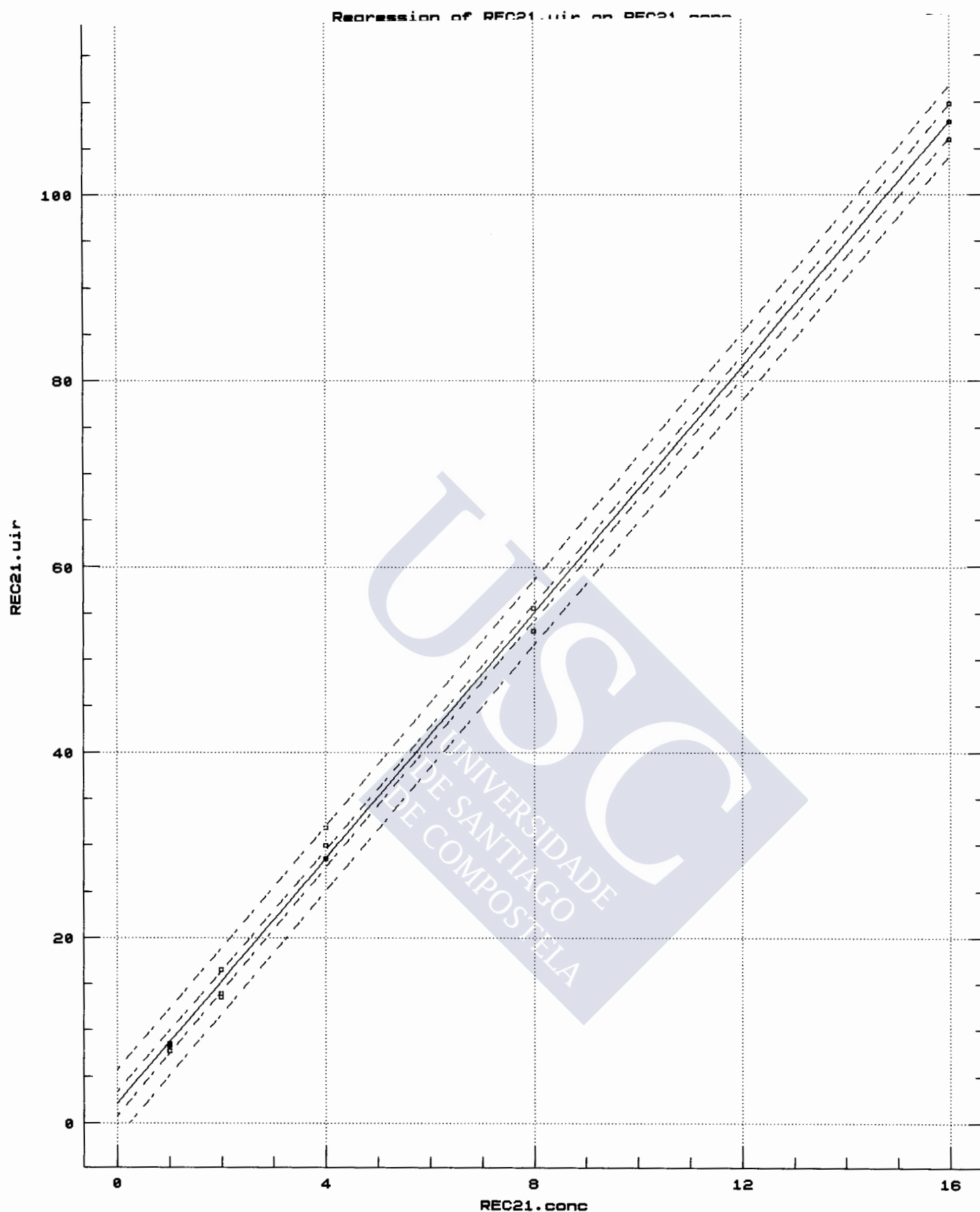


Figura 17.- Recta de calibrado del benzo(a)pireno en n-hexano obtenida por espectrofluorimetría sincrónica con aplicación de segunda derivada ($\Delta\lambda$ 110 nm, rango 1-16 $\mu\text{g/L}$)

Para evitar oscilaciones en el tiempo de retención, debido a variaciones de la temperatura ambiental a lo largo del día, fue necesaria la estabilización de la temperatura de la columna, eligiéndose 38 °C (WISE y col., 1993; MÄKELA y PYY, 1995). El mantenimiento de la temperatura se consiguió haciendo recircular con un baño, agua a 38 °C a través de un serpentín de cobre que recubría la columna (Figura18).

Una vez fijada la temperatura, y con una fase móvil de ACN:agua (85:15), se procedió a optimizar el flujo con el fin de obtener una buena resolución de los picos. Para ello, y valiéndonos del software System Suitability Test (SST), se determinó la eficacia de la columna a diferentes flujos, obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla XII

Flow (mL/min)	Retention time (min)	Th. Plate Number
1.5	8.16	4417
1	11.65	5834
0.75	15.13	6235
0.5	22.49	7313
0.4	27.91	7452
0.3	37.49	7440

Como se puede observar, el número de platos teóricos aumenta desde 4417 hasta 7452 al disminuir el flujo de 1.5 a 0.4 mL/min, llegado este punto, mayores disminuciones del flujo, no mejoran la eficacia de la columna. Finalmente, y llegando a un compromiso entre tiempo y eficacia, el flujo elegido fue 0.5 mL/min.

En las tablas XIII y XIV y en la figura 19, se recogen las características del pico cromatográfico del benzo(a)pireno obtenido con estas condiciones.

2.4. Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección y cuantificación para el B(a)P en ACN, se han calculado según las normas de la ACS (1980). A continuación se expone el esquema de trabajo seguido:

(1) Se hicieron diez lecturas de un blanco de ACN en las condiciones cromatográficas previamente seleccionadas.

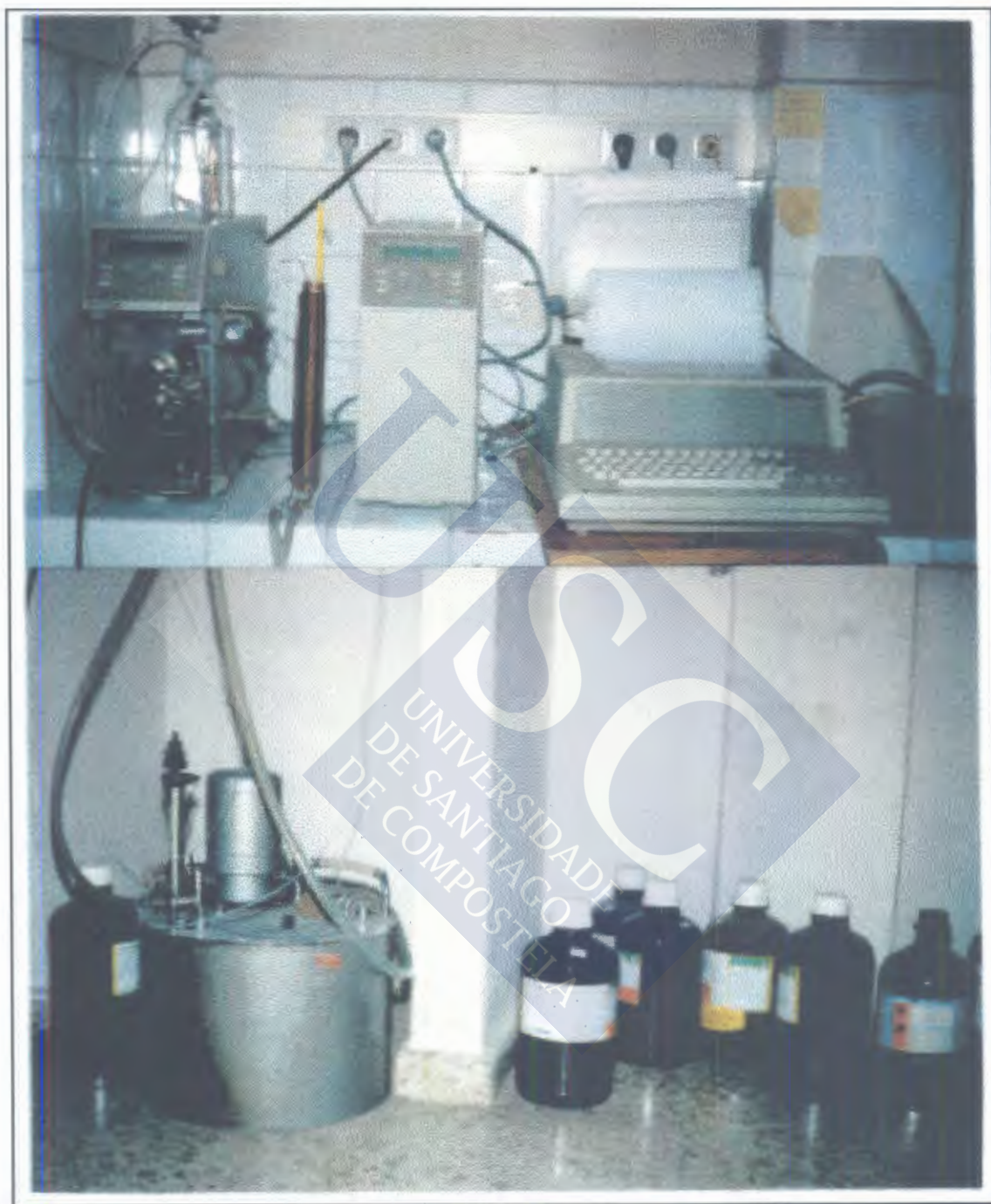


Figura 18.- Sistema de mantenimiento de la temperatura de la columna de HPLC

TABLA XIII.- Características del pico cromatográfico del benzo(a)pireno según la Farmacopea Europea (EP)

EP				
Peak	Retention time	Th. Plate Number	Tailing Factor	Capacity Factor
B(a)P	22.79	7632	1.26	10.28

TABLA XIV.- Características del pico cromatográfico del benzo(a)pireno según la Farmacopea Americana (USP)

USP				
Peak	Retention time	Th. Plate Number	Tailing Factor	Capacity Factor
B(a)P	22.79	7624	1.26	10.28

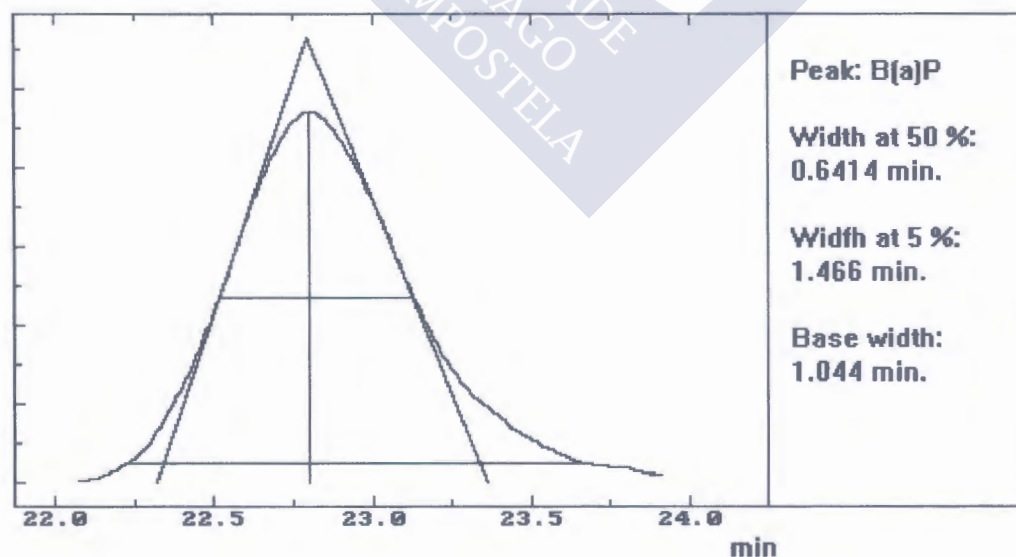


Figura 19.- Anchuras características del pico cromatográfico del benzo(a)pireno

(2) Se midieron, en mV, la altura máxima y mínima de los blancos durante el tiempo en el que sale el pico del B(a)P (21-24 min), y se determinó la altura total en valor absoluto.

(3) Con estos datos se calcula la media (\bar{X}) y la desviación estándar (SD), y a partir de ellos el límite de detección y cuantificación en mV, 882 y 1610 respectivamente (Tabla XV).

(4) Conocido el LQ, se obtuvo la recta de calibrado calculada por análisis de regresión de las concentraciones 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 μg de benzo(a)pireno por Litro de acetonitrilo, medidas por triplicado, frente a las alturas, en mV, calculadas en las condiciones de trabajo (ACS, 1980).

$$\text{Altura} = 18117 [\text{C}] + 0.0523 \quad (r = 0.9997) \quad (\text{rango } 0.25\text{-}16 \mu\text{g/L})$$

(5) Mediante la recta de calibrado en alturas, es posible determinar el LD y el LQ del benzo(a)pireno en $\mu\text{g/L}$, siendo en este caso 0.049 y 0.089 $\mu\text{g/L}$, respectivamente (Tabla XV).

Tabla XV.- Límites de detección (LD) y cuantificación (LQ) del benzo(a)pireno en ACN obtenidos por HPLC-FL ($\lambda_{\text{exc.}} = 296$ y $\lambda_{\text{em.}} = 406$)

\bar{X}_{blanco} (Mv)	SD (Mv)	LD (Mv)	LQ (Mv)	LD ($\mu\text{g/L}$)	LQ ($\mu\text{g/L}$)
570	104	882	1610	0.049	0.089

Los límites de detección y de cuantificación expresados en μg de B(a)P por Kg de materia húmeda, se calculan dividiendo los valores correspondientes en $\mu\text{g/L}$, por la cantidad de muestra, en materia húmeda, analizada (asumiendo que en el método se concentra hasta un volumen final de ACN de 1 mL).

Cómo el análisis se ha realizado en todas las muestras partiendo de 5 g de sustancia liofilizada (materia seca), el límite de detección y de cuantificación alcanzado, varía en función de la humedad, permitiendo en todas las muestras, la determinación de benzo(a)pireno a los niveles requeridos por la legislación (0.03 $\mu\text{g/Kg}$) (Tabla XVI).

Tabla XVI.- Límites de detección (LD) y cuantificación (LQ) del benzo(a)pireno en función del % Humedad (p/p) de las muestras

Muestra (g m.s.)	Humedad (% p/p)	Muestra (g m.h.)	LD ($\mu\text{g/Kg}^*$)	LQ ($\mu\text{g/Kg}^*$)
5.00	0	5.00	9.8×10^{-3}	0.018
5.00	30	7.14	6.7×10^{-3}	0.012
5.00	40	8.33	5.9×10^{-3}	0.011
5.00	50	10.0	4.9×10^{-3}	8.9×10^{-3}
5.00	60	12.5	3.9×10^{-3}	7.1×10^{-3}
5.00	70	16.7	2.9×10^{-3}	5.3×10^{-3}
5.00	80	25.0	1.9×10^{-3}	3.6×10^{-3}

* Expresado en materia húmeda

2.5. CUANTIFICACIÓN Y LINEARIDAD DE LA RESPUESTA DEL DETECTOR

La concentración del B(a)P en las muestras se determina a partir de la recta de calibrado obtenida por análisis de regresión de las concentraciones 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 μg de benzo(a)pireno por litro de acetonitrilo, medidas por triplicado, frente a las áreas de los picos (ACS, 1980):

$$\text{Area} = 1572819 [\text{I}] - 0.0333 \quad (r = 0.9999) \quad (\text{rango } 0.25\text{-}16 \mu\text{g/L})$$

La recta encontrada es lineal en el rango de las concentraciones experimentales estudiadas, tal y como se demuestra en la figura 20.

La concentración de B(a)P expresada en $\mu\text{g/Kg}$ de producto en muestra húmeda, se calcula dividiendo su concentración en $\mu\text{g/L}$ en el eluato de ACN, por la cantidad de muestra en materia húmeda.

2.6. CONFIRMACIÓN DE RESULTADOS

Aunque inicialmente se pensó confirmar la presencia de B(a)P mediante HPLC-UV, las pruebas realizadas con este último demostraron que sólo es sensible para concentraciones mucho más elevadas que las que se obtienen en las muestras analizadas.

(X 1E7)

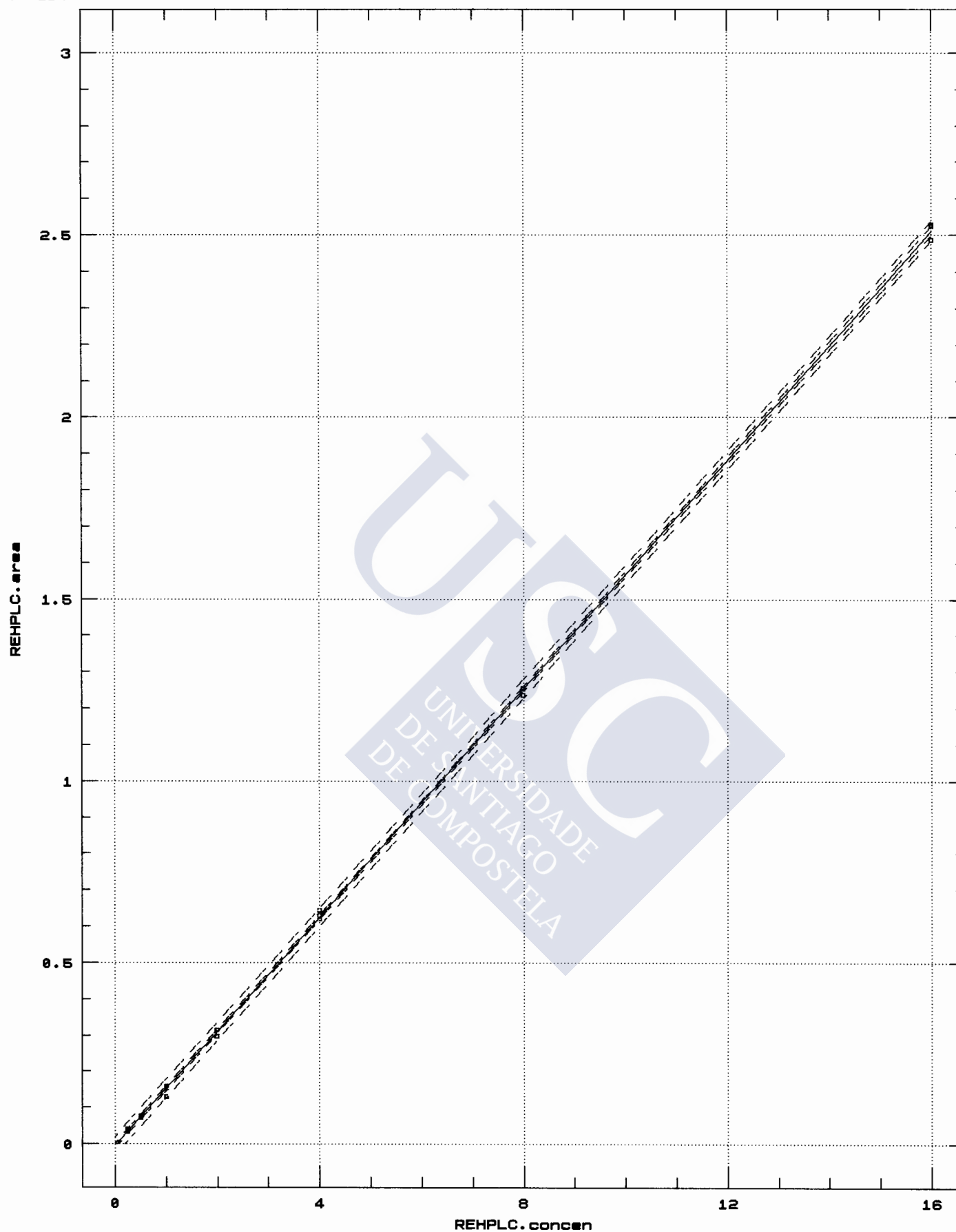


Figura 20.- Recta de calibrado del benzo(a)pireno en ACN obtenida mediante HPLC-FL con $\lambda_{exc.} = 296$ nm, $\lambda_{em.} = 406$ nm (rango 0.25-16 $\mu\text{g/L}$)

Finalmente, la confirmación se realizó de las siguientes formas:

- Mediante la técnica de HPLC-FL utilizando 426 nm para la longitud de onda de emisión:

La relación de áreas obtenidas en las condiciones de cuantificación y en éstas de confirmación, es constante e independiente de la concentración de B(a)P presente (\bar{X} = 1.33; C_v % = 7.9). (Figuras 21 y 22)

Los límites de detección y cuantificación encontrados con estas longitudes de onda son 0.051 y 0.100 $\mu\text{g/L}$, respectivamente, y han sido calculados de la misma forma que anteriormente se cita.

- Mediante la realización de espectros de emisión y espectros en modo sincron sin parar el barrido:

Una vez realizados los espectros de emisión y en modo sincron en las condiciones de trabajo citadas en la parte experimental, éstos quedan almacenados momentaneamente en el detector de fluorescencia hasta la próxima inyección, debiendo ser recuperados como archivo con extensión "raw" mediante la opción "replay". La velocidad con la que el detector envía al integrador estos espectros, puede ser controlada, fijándose en nuestro caso a 20 nm/seg.

Estos archivos son visualizados mediante el software WOW como un cromatograma convencional, es decir en el eje de las abcisas los tiempos de retención en segundos y en las ordenadas la intensidad en mV. Mediante el cursor podemos determinar el tiempo al que sale el máximo de intensidad, y al conocer el rango espectral (100 nm) y la velocidad de envío (20 nm/seg) podemos calcular la longitud de onda de excitación correspondiente a dicho máximo, que es , en el caso del B(a)P, 406 nm en el espectro de emisión y 296 nm en el espectro sincrónico.

Posteriormente, fue necesaria la manipulación de dichos espectros mediante el software PAINTBRUSH para transformar el eje de las abcisas en unidades de longitud de onda (nm).

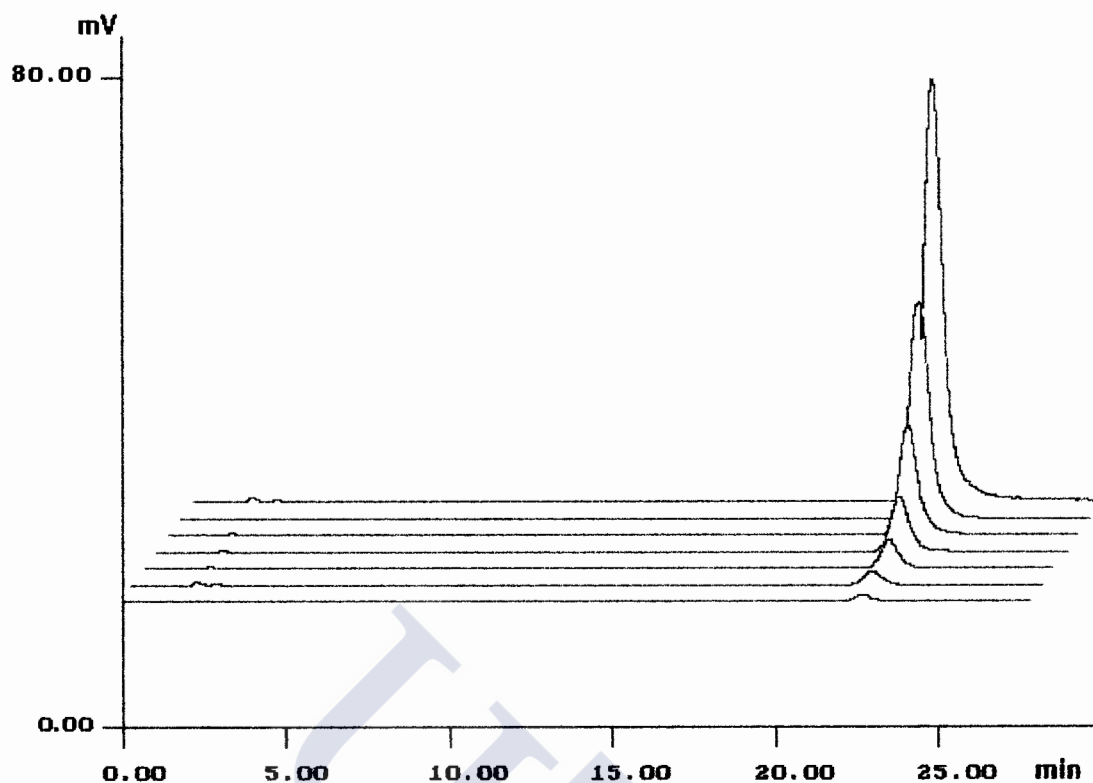


Figura 21: Cromatogramas de benzo(a)pireno en ACN (0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 µg/L)
($\lambda_{exc.} = 296$, $\lambda_{em.} = 406$)

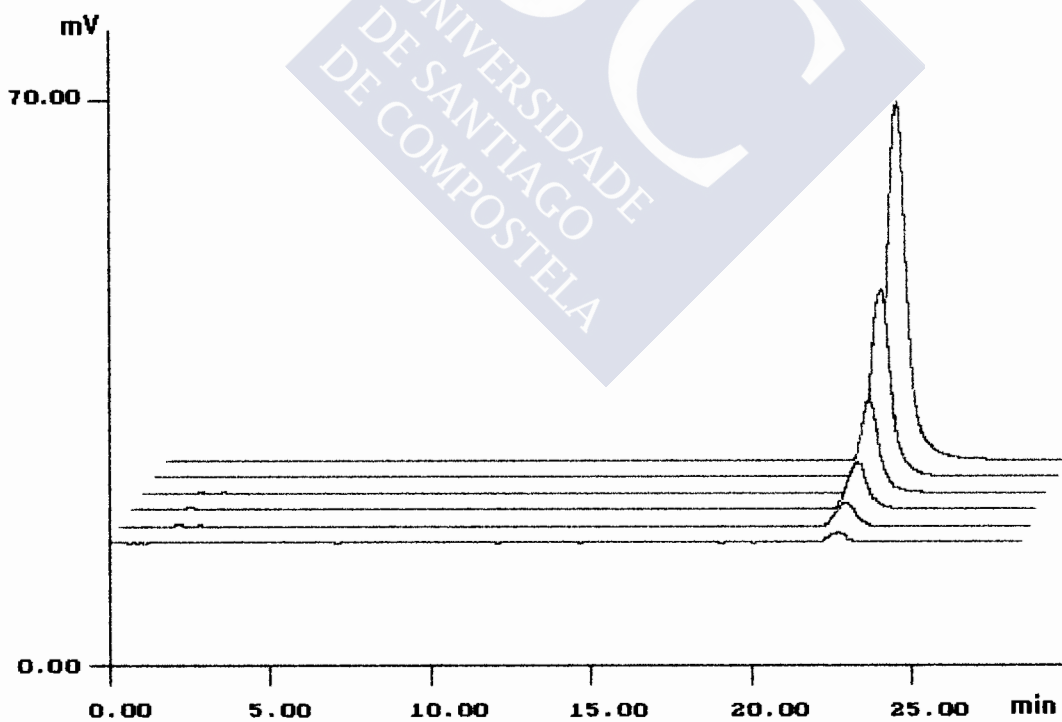


Figura 22: Cromatogramas de benzo(a)pireno en ACN (0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 µg/L)
($\lambda_{exc.} = 296$, $\lambda_{em.} = 426$)

Para que la confirmación mediante esta técnica sea totalmente fiable, se necesitan concentraciones de benzo(a)pireno superiores a 1 $\mu\text{g/L}$ y 2 $\mu\text{g/L}$, para el modo sincrónico y para la emisión respectivamente, ya que cantidades más bajas no son detectables (Figuras 23 y 24). En caso de que dichos espectros no sean fiables por bajas concentraciones de B(a)P en la muestra, se debe concentrar la solución de ACN previamente a la realización de los mismos.

2.7. PRECISIÓN

La precisión del método se ha calculado sometiendo al procedimiento experimental descrito seis muestras de la misma salchicha (muestra 9), en cuya etiqueta se indica que ha sido sometida a ahumado tradicional (Tabla XVII).

Tabla XVII.- RSD del método obtenida para la muestra nº 9 (salchicha "frankfurt")

Muestra	Benzo(a)pireno ($\mu\text{g/Kg}$)*
6	0.043
6	0.050
6	0.056
6	0.053
6	0.050
6	0.056
$\bar{X} = 0.051$	
RSD = 9.6	

* expresado en materia húmeda

2.8. RECUPERACIÓN

La recuperación del método, se ha calculado como la media de las recuperaciones obtenidas al someter las siguientes muestras al procedimiento de análisis descrito:

a) Seis muestras de un mismo tipo de salchicha "frankfurt" (63 % (p/p) agua), que, según el etiquetado, no han sido sometidas a ahumado tradicional ni adicionadas de extracto de humo. Una vez chequeadas para comprobar que el benzo(a)pireno se encuentra por debajo de los límites de detección del método, fueron sobrecargadas con este PAH a dos niveles, 0.03 $\mu\text{g/Kg}$ (cantidad máxima permitida por la legislación para alimentos y bebidas adicionadas de aromas de humo) y 0.44 $\mu\text{g/Kg}$. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla XVIII.

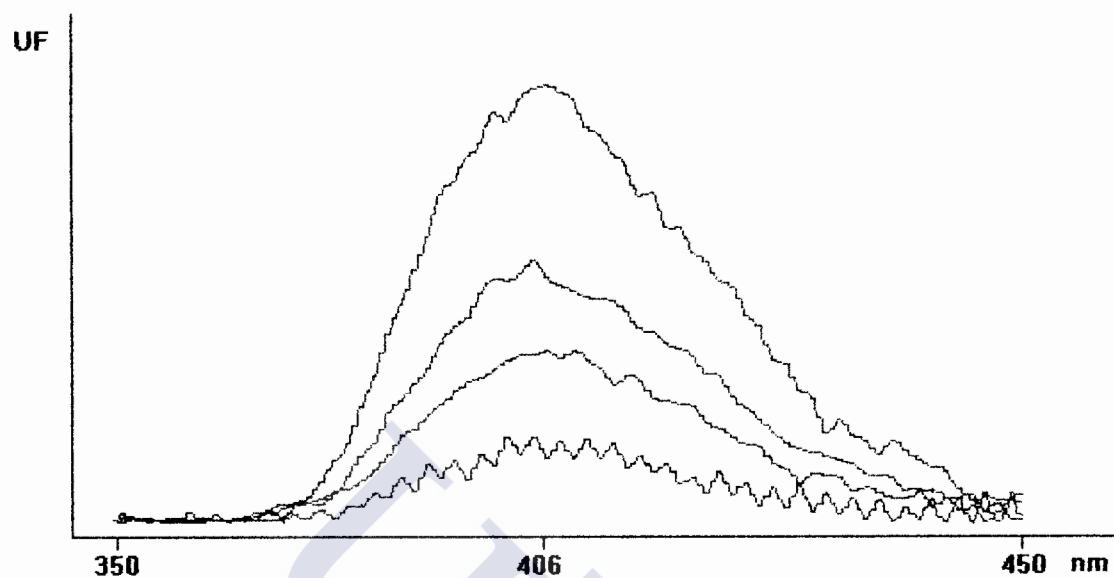


Figura 23: Espectros de emisión de benzo(a)pireno en ACN (2, 4, 8 y16 µg/L),
realizados mediante HPLC-FL

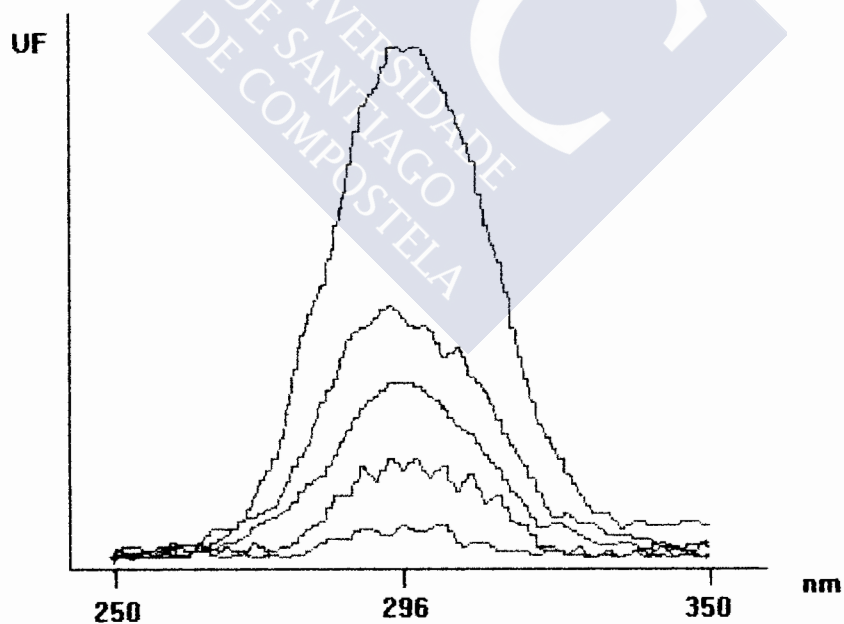


Figura 24: Espectros sincrónicos de benzo(a)pireno en ACN (1, 2, 4, 8 y 16 µg/L),
realizados mediante HPLC-FL

Tabla XVIII.- RSD y % R obtenidas al someter seis veces al procedimiento experimental descrito una muestra de salchicha sobrecargada con benzo(a)pireno

Cantidad añadida ($\mu\text{g/Kg}^*$)	\bar{X} encontrada ($\mu\text{g/Kg}$)	Precisión (RSD)	Recuperación (% R)
0.030	0.028	8.65	94.16
0.44	0.32	8.80	73.99

* Expresado en materia húmeda

b) Seis muestras de palometa fresca (79 % (p/p) agua), no sometida a ahumado tradicional ni adicionada con aroma de humo (no está permitida esta práctica en pescados). Tras chequear la ausencia de B(a)P se sobrecargó la muestra con B(a)P a dos niveles, 0.065 $\mu\text{g/Kg}$ y 0.26 $\mu\text{g/Kg}$ (Tabla XIX).

Tabla XIX.- RSD y % R obtenidas al someter seis veces al procedimiento experimental descrito una muestra de palometa sobrecargada con benzo(a)pireno

Cantidad añadida ($\mu\text{g/Kg}^*$)	\bar{X} encontrada ($\mu\text{g/Kg}^*$)	Precisión (RSD)	Recuperación (% R)
0.060	0.057	6.06	94.62
0.26	0.24	5.43	93.54

* Expresado en materia húmeda

A la vista de los resultados, se observan diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los porcentajes de recuperación obtenidos a los dos niveles de sobrecarga de la muestra de salchicha "*frankfurt*", no habiéndolas para la muestra de palometa. Este hecho podría deberse a que la sobrecarga correspondiente a 0.44 $\mu\text{g/Kg}$, a diferencia de la de 0.03 $\mu\text{g/Kg}$, se realizó tras haber transcurrido bastante tiempo desde el momento de su liofilización. Como ya se ha comentado anteriormente, se observa un considerable incremento en la formación de emulsiones (especialmente en las muestras con alto contenido lipídico) cuando permanecen almacenadas durante mucho tiempo, posiblemente debido a un enranciamiento de las grasas. Este fenómeno lleva a obtener recuperaciones incompletas, y de ahí la importancia de que las muestras sean analizadas inmediatamente después de su liofilización.

2.9. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

Se han analizado un total de 51 muestras, correspondientes 25 a pescados, 23 a derivados cárnicos, 3 a quesos y 1 aperitivo, todas ellas ahumadas y/o adicionadas con aroma de humo, según se indica en el etiquetado correspondiente. Se ha determinado, previamente al análisis de benzo(a)pireno, la humedad por diferencia de pesada antes y después de la liofilización (Tabla XX), ya que es necesario este dato para poder expresar los resultados según establece la legislación en μg de B(a)P por Kg de alimento, en materia total.

El contenido de benzo(a)pireno así como el porcentaje de humedad de las muestras analizadas, se recoge en la Tabla XX.

Las muestras adicionadas de aromas de humo, presentan todas ellas valores de B(a)P más bajos (valor medio $0.014 \mu\text{g/Kg}$) al fijado por la legislación. Estas muestras corresponden a derivados cárnicos tratados con calor, siendo éstas junto con los quesos las únicas muestras que pueden llevar este tipo de aditivos, según establece nuestra legislación.

En la muestra de "patatas barbacoa" nº 27, aunque en su etiquetado no está indicada claramente la adición de aroma de humo, se ha encontrado un valor de $0.13 \mu\text{g/Kg}$, que está en consonancia con las características organolépticas de las mismas.

Los productos ahumados de forma natural, para los cuales no existen límites actualmente, presentan cantidades variables:

- De las 12 muestras de salchichas de diversos tipos analizadas, tan sólo una de ellas no presenta benzo(a)pireno en cantidad detectable, siendo el valor más alto encontrado de $0.051 \mu\text{g/Kg}$ (muestra nº 9) (Figura 25), con un valor medio de $0.022 \mu\text{g/Kg}$. En los otros productos cárnicos las dos muestras de chorizo son las que presentan con mucha diferencia, mayor concentración de benzo(a)pireno (0.34 y $0.12 \mu\text{g/Kg}$) (Figura 26). El hecho de que las salchichas presenten concentraciones más bajas de B(a)P que las encontradas en las muestras de chorizo puede deberse a que en las primeras el ahumado se realiza cuando la masa está embutida en una tripa, normalmente de celofán, que es eliminada mecánicamente una vez finalizado dicho proceso. Los componentes del humo, incluidos los PAH, quedan depositados mayoritariamente en el celofán, mientras que en el caso del chorizo, la tripa no es eliminada, pudiendo producirse durante su almacenamiento una redistribución de estos residuos hacia el interior de la pieza.

SALCHICHA MUESTRA N° 9

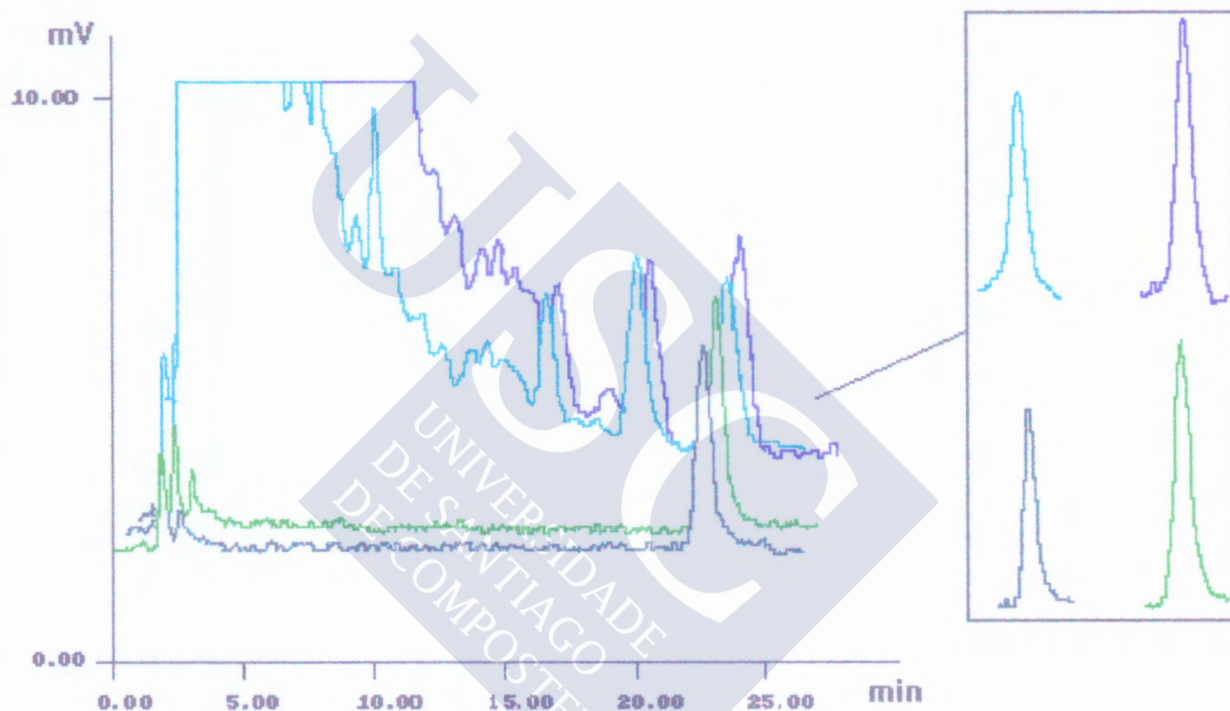


Figura 25: Cromatogramas de 0.5 $\mu\text{g/L}$ de benzo(a)pireno en ACN ($\lambda_{\text{exc.}} = 296 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 426 \text{ nm}$ (verde oscuro)) ($\lambda_{\text{exc.}} = 296 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 406 \text{ nm}$ (verde claro)); y de la muestra n° 9 ($\lambda_{\text{exc.}} = 296 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 426 \text{ nm}$ (azul claro)) ($\lambda_{\text{exc.}} = 296 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 406 \text{ nm}$ (azul oscuro))

Relación de áreas del patrón: 1.33

Relación de áreas de la muestra: 1.30

CHORIZO MUESTRA N° 20

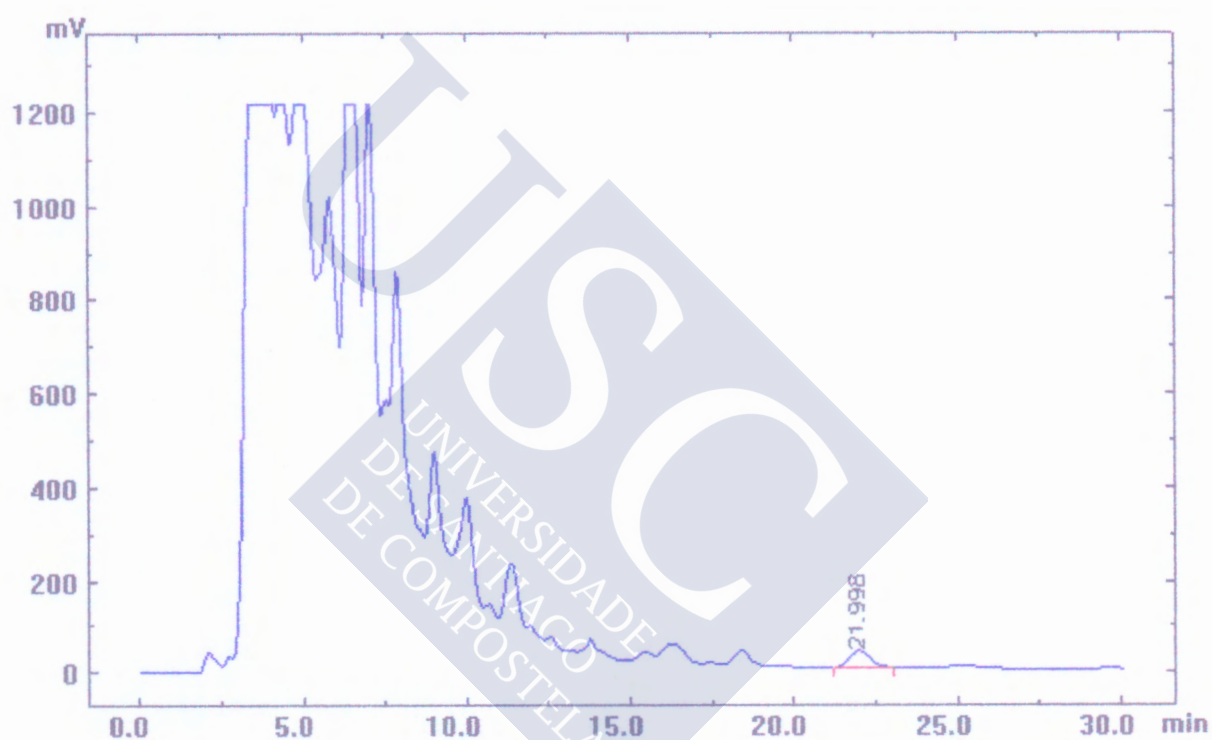


Figura 26: Cromatograma de la muestra n° 20 ($\lambda_{exc.} \approx 296$, $\lambda_{em.} = 406$)

- Con relación a las muestras de queso ahumado destaca la muestra nº 24 con un contenido de benzo(a)pireno de 0.91 $\mu\text{g/Kg}$ (Figura 27).

- En los pescados ahumados de forma natural se han obtenido los valores más elevados (2.5 $\mu\text{g/Kg}$ en la muestra 48 correspondiente a: sardina) (Fig. 28), con un valor medio de 0.20 $\mu\text{g/Kg}$. Al respecto, debe hacerse notar que en las muestras que se presentan en lonchas se encuentran valores de B(a)P más bajos que los hallados en aquellas que se comercializan enteras. Ello puede ser debido a que, si bien en ambos casos el ahumado se realiza con el pescado entero, la manipulación posterior difiere en uno y otro, eliminándose la piel en los que se envasan en lonchas, pero no en los que se envasan enteros, y es precisamente en la piel donde mayoritariamente se depositan los componentes del humo, entre ellos los PAH.

- En la muestra nº 43 correspondiente a un salmón enlatado, se analizó separadamente la carne y el aceite. Mientras que en la carne la cantidad de B(a)P encontrada fue de 0.045 $\mu\text{g/kg}$, en el aceite fue de 0.93 $\mu\text{g/Kg}$, lo que confirma la afinidad de los PAH por la grasa.

Con relación al contenido en humedad de las muestras, se observa una probable relación entre bajo contenido en agua y mayor proporción de benzo(a)pireno (muestras nº 20, 21, 24, 38 y 48), debido posiblemente a que la capacidad de impregnación del humo es mayor cuanto más seco se encuentre el producto.

Respecto a la trascendencia del tipo de madera utilizada en el ahumado, resulta difícil extraer conclusiones al respecto, puesto que la naturaleza de aquella tan sólo es citada en el etiquetado de ciertos productos pesqueros, los cuales, ya por razones de conservación del producto, y/o por su influencia en las características organolépticas del mismo, poseen una mayor tradición en la técnica del ahumado. Sin embargo, tal técnica, el modo en que arde la madera, la temperatura de obtención del humo, y el tiempo de exposición, son parámetros de gran importancia que influyen en la composición del humo y por tanto en la mayor o menor presencia de PAH, pero que son desconocidos por nosotros y probablemente en muchas industrias artesanales no estén perfectamente controlados.

QUESO MUESTRA N° 24

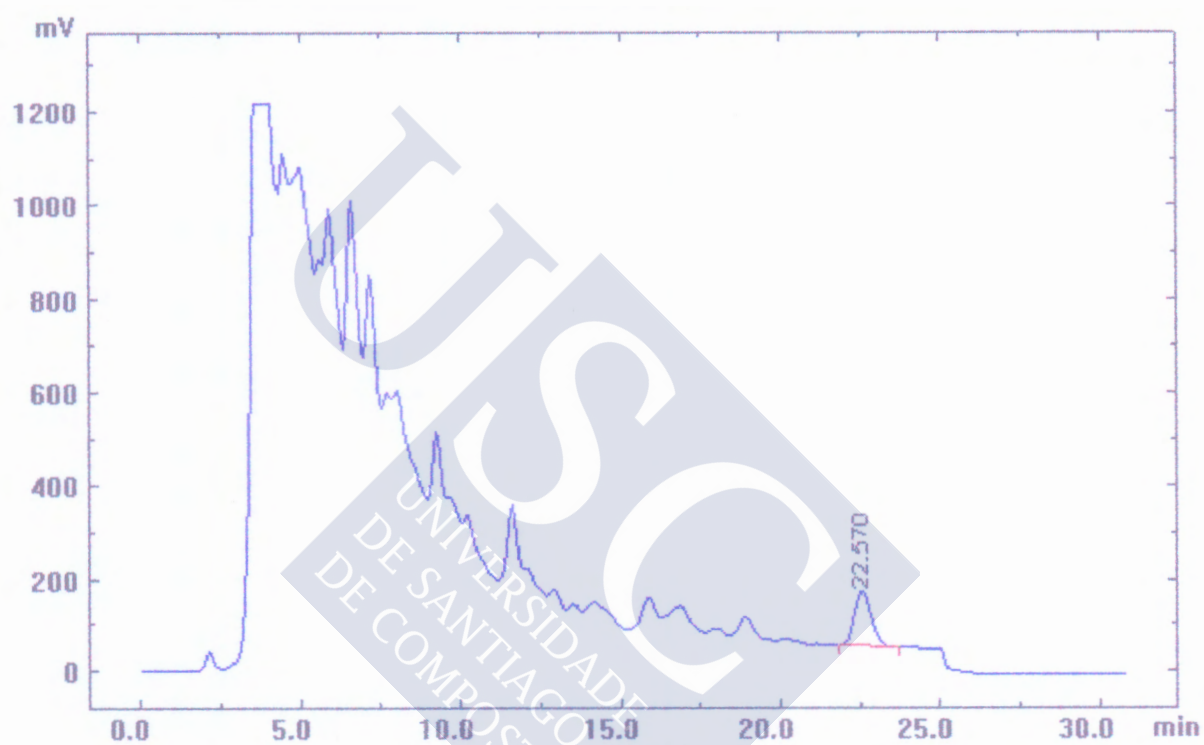


Figura 27: Cromatograma de la muestra n° 24 ($\lambda_{exc.} := 296$, $\lambda_{em.} := 406$)

SARDINA MUESTRA N° 48

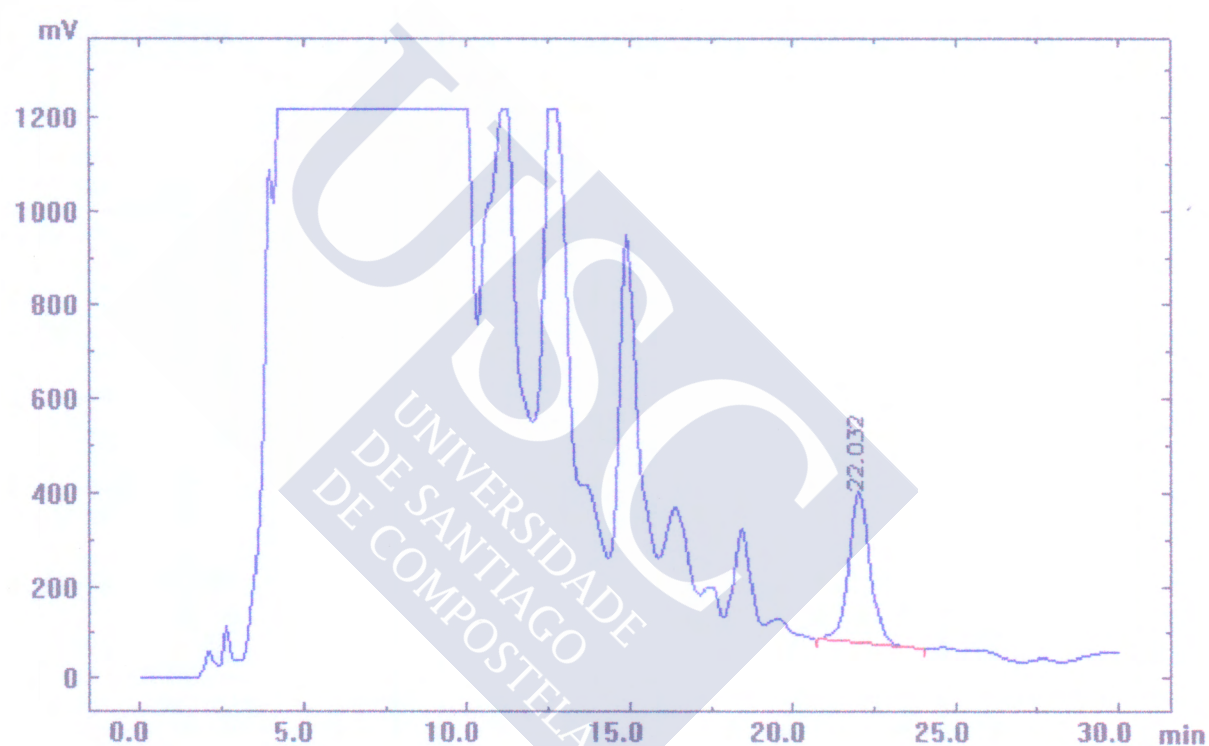


Figura 28: Cromatograma de la muestra n° 48 ($\lambda_{exc.} = 296$, $\lambda_{em.} = 406$)

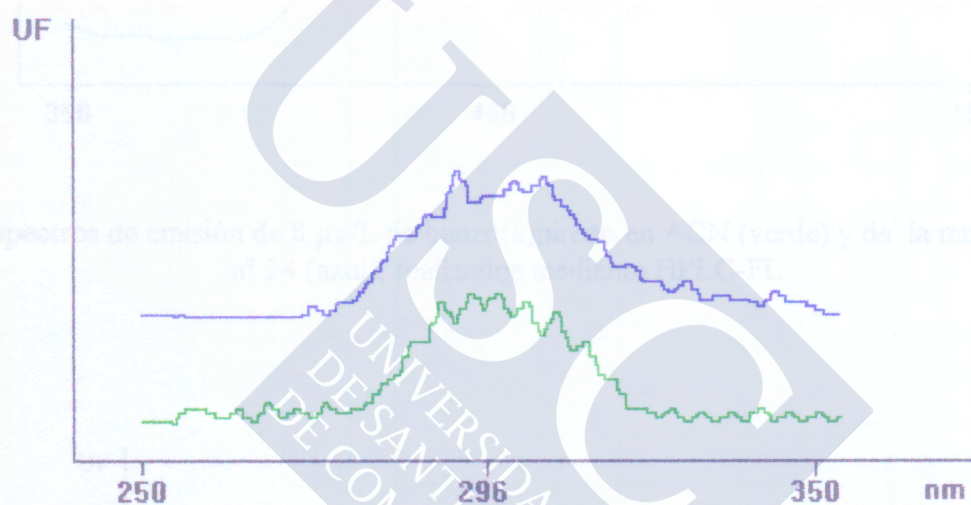
De todas las muestras estudiadas, se observa por tanto y como era de esperar, que los resultados más elevados corresponden a aquellas sometidas a ahumado natural, mientras que las muestras adicionadas de extractos de humo presentan los valores más bajos y siempre dentro del límite establecido por la legislación, aunque son pocos los productos comercializados actualmente sometidos a este tipo de tecnología. Además nuestra legislación como ya se ha indicado, sólo permite la adición de aroma de humo a derivados cárnicos y quesos.

Los ensayos de confirmación han sido realizados en todas las muestras, observándose en la figura 25 los cromatogramas con longitudes de onda de emisión 406 y 426 nm respectivamente, para la muestra nº 9, con su relación de áreas.

En las figuras 29 a 31, se recogen los los espectros sincrónicos y de emisión realizados mediante HPLC-FL correspondientes a las muestras nº 20, 24 y 48, y su comparación con patrones de benzo(a)pireno.

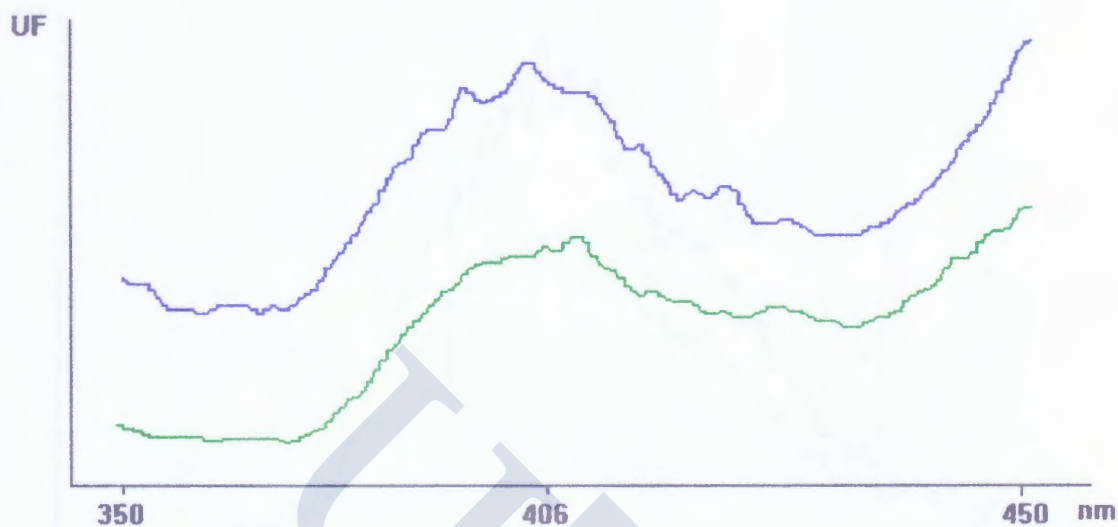


CHORIZO MUESTRA N° 20

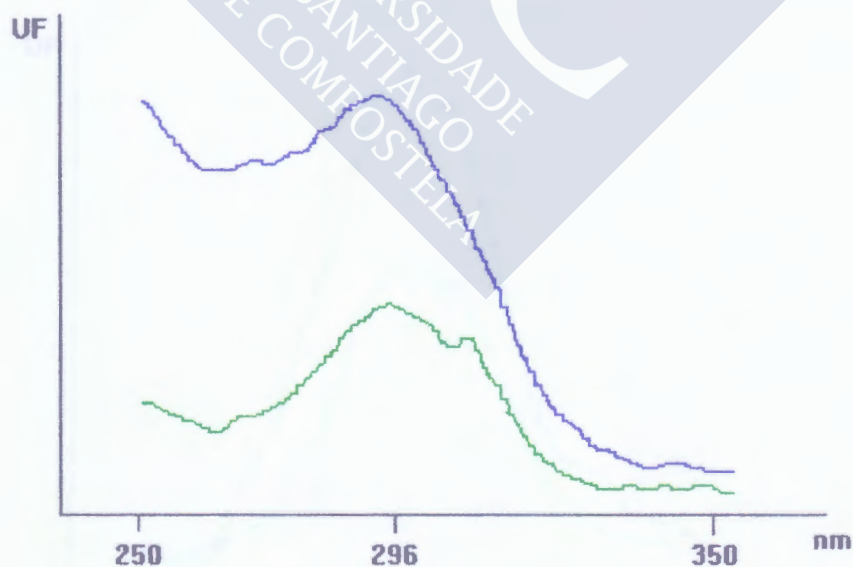


Espectros sincrónicos de 2 $\mu\text{g/L}$ de benzo(a)pireno en ACN (verde) y de la muestra n° 20 (azul), realizados mediante HPLC-FL

Figura 29

QUESO MUESTRA N° 24

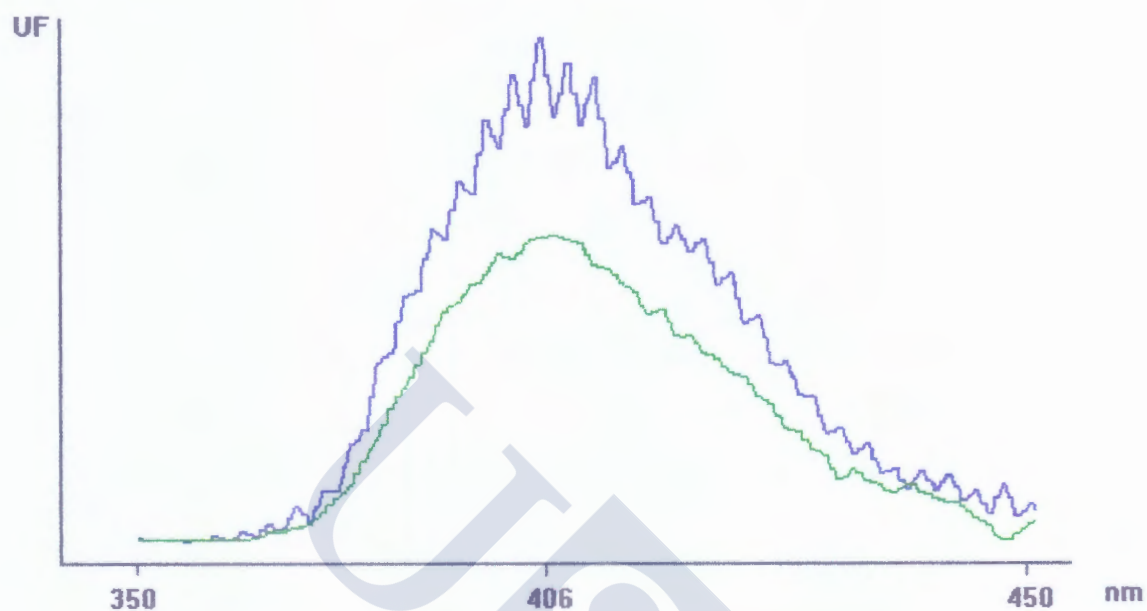
Espectros de emisión de 8 $\mu\text{g/L}$ de benzo(a)pireno en ACN (verde) y de la muestra n° 24 (azul), realizados mediante HPLC-FL



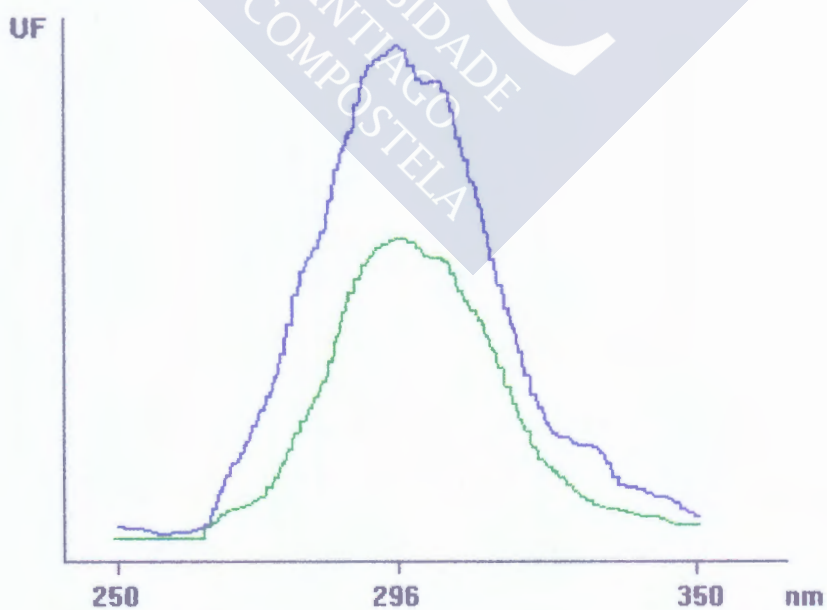
Espectros sincrónicos de 8 $\mu\text{g/L}$ de benzo(a)pireno en ACN (verde) y de la muestra n° 24 (azul), realizados mediante HPLC-FL

Figura 30

SARDINA MUESTRA N° 48



Espectros de emisión de 16 $\mu\text{g/L}$ de benzo(a)pireno en ACN (verde) y de la muestra n° 48 (azul), realizados mediante HPLC-FL



Espectros sincrónicos de 16 $\mu\text{g/L}$ de benzo(a)pireno en ACN (verde) y de la muestra n° 48 (azul), realizados mediante HPLC-FL

Figura 31

TABLA XX.- Contenido en benzo(a)pireno ($\mu\text{g/Kg}$) y porcentaje de humedad (p/p) en las muestras analizadas

PRODUCTOS CON EXTRACTO DE HUMO

Nº de muestra	Producto	% Humedad (p/p)	B(a)P ($\mu\text{g/kg}$)*
1	Jamón cocido	65.24	ND
2	Paleta cocida	71.08	0.014
3	Paleta cocida	72.39	ND
4	Salchicha cocida	59.64	0.021
5	Salchicha cocida <i>frankfurt</i>	58.71	0.026
6	Salchicha cocida <i>frankfurt</i>	58.10	0.021
			$\bar{X} = 0.014$

* Resultados expresados en materia húmeda.

SALCHICHAS COCIDAS Y AHUMADAS

Nº muestra	Producto	% Humedad (p/p)	B(a)P ($\mu\text{g/Kg}$)*
7	Salchichas <i>Frankfurt</i>	54.97	NM
8	Salchichas <i>Frankfurt</i>	62.97	0.021
9	Salchichas <i>Frankfurt</i>	66.90	0.051
10	Salchichas <i>Frankfurt</i>	58.15	0.027
11	Sachicha <i>frankfurt</i> bacon-queso	62.16	0.016
12	Salchicha <i>frankfurt</i> chorizo	46.66	0.027
13	Salchicha <i>viena</i>	52.82	0.030
14	Salchicha <i>viena</i> bacon-queso	63.97	0.0080
15	Salchichas <i>aperitivo</i>	66.95	ND
16	Salchichas <i>aperitivo</i>	58.17	0.020
17	Salchicha <i>parmesan</i>	49.91	0.040
18	Salchicha <i>snackis</i>	59.52	0.025
			0.022

* Resultados expresados en materia húmeda.

TABLA XX.- Contenido en benzo(a)pireno ($\mu\text{g/Kg}$) y porcentaje de humedad (p/p) en las muestras analizadas (continúa)

DERIVADOS CÁRNICOS AHUMADOS

Nº muestra	Producto	% Humedad (p/p)	B(a)P ($\mu\text{g/Kg}$)*
19	Bacon	45.28	0.011
20	Chorizo	18.24	0.34
21	Chorizo	14.14	0.12
22	Lomo	74.24	0.0090
23	Mortadela <i>Boloñesa</i>	60.03	0.017
			0.099

* Resultados expresados en materia húmeda.

QUESOS AHUMADOS

Nº muestra	Producto	% Humedad (p/p)	B(a)P ($\mu\text{g/Kg}$)*
24	Queso ahumado	21.44	0.91
25	Queso ahumado con <i>jamón</i>	38.88	NM
26	Queso ahumado con <i>jamón</i>	51.63	0.13

* Resultados expresados en materia húmeda.

APERITIVOS FRITOS CON SABOR A CARNE AHUMADA

Nº muestra	Producto	B(a)P ($\mu\text{g/Kg}$)*
27	Patatas barbacoa	0.13

* Resultados expresados en materia húmeda.

TABLA XX.- Contenido en benzo(a)pireno ($\mu\text{g/Kg}$) y porcentaje de humedad (p/p) en las muestras analizadas (continúa)

PESCADOS AHUMADOS

Nº muestra	Producto	% Humedad (p/p)	B(a)P ($\mu\text{g/kg}$)*
28	Anchoa	63.75	0.019
29	Anchoa	61.44	0.013
30	Arenque	43.94	0.040
31	Arenque	49.04	0.071
32	Arenque fileteado	56.97	0.040
33	Atún en lonchas	56.71	NM
34	Atún en lonchas	52.74	0.023
35	Atún en lonchas	57.86	0.022
36	Bacalao en lonchas	73.03	0.018
37	Caballa	40.41	0.087
38	Caballa	34.44	0.83
39	Palometa en lonchas	69.94	ND
40	Palometa en lonchas	67.77	NM
41	Pez Espada en lonchas	60.44	0.035
42	Pez Espada en lonchas	56.56	NM
43	Salmón en aceite enlatado	63.16	0.045
43	Aceite del salmón enlatado		0.93
44	Salmón en lonchas	53.44	ND
45	Salmón en lonchas	59.51	0.040
46	Salmón en lonchas	52.93	ND
47	Paté de salmón	57.08	0.13
48	Sardina	36.93	2.46
49	Trucha en lonchas	65.47	0.057
50	Trucha en lonchas	58.46	ND
51	Trucha en lonchas	62.05	0.032
			$\bar{X} = 0.20$

* Resultados expresados en materia húmeda.

**DETERMINACIÓN DE BENZO(a)PIRENO EN AROMAS DE
HUMO LIPOSOLUBLES MEDIANTE HPLC-FL**



1. PROTOCOLO ANALÍTICO

1.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

La muestra analizada es un aroma de humo líquido liposoluble (AHLL), donada por una casa comercial. Está contenida en frasco de vidrio color topacio.

La cantidad a añadir recomendada por los fabricantes es 2 g/Kg de producto.

1.2. PROCEDIMIENTO (GARCÍA FALCÓN y col., 1996 b)

1.2.1. EXTRACCIÓN

2 g de AHLL fueron disueltos en 5 mL de n-hexano y transferidos a una ampolla de separación. Esta solución fue extraída con 5, 3 y 2 mL de DMSO (previamente saturado con n-hexano) durante 5 min cada vez. Si hay formación de emulsiones, éstas se rompen por adición de solución de cloruro sódico al 2 % (p/v).

1.2.2. PURIFICACIÓN

El extracto de DMSO (10 mL) se mezcla con 24 mL de agua MILLI-Q, y se pasa a través de un cartucho Sep Pak Plus C-18, previamente activado con 5 mL de ACN seguidos de 10 mL de agua MILLI-Q. Las paredes del recipiente que contenían la solución, fueron lavadas con 10 mL de agua y pasadas también por la minicolumna. El eluato acuoso de DMSO se rechaza. La Sep Pak C-18, en la que está retenido el B(a)P, se seca bajo corriente de nitrógeno y se une en serie con una Sep Pak sílica Plus, eluyéndose el B(a)P de la C18 con 5 mL de n-hexano, quedando ahora el analito retenido en la minicolumna de sílica. Se desecha el cartucho C-18 y se pasan finalmente 10 mL de n-hexano a través de la sílica para completar la elución, recogiendo un volumen final de 15 mL, que se evapora a sequedad bajo corriente de nitrógeno y se redisuelve en 1 mL de ACN para ser analizado por HPLC-FL.

1.2.3. ANÁLISIS Y CONFIRMACIÓN DE RESULTADOS

El análisis de B(a)P en el eluato de ACN se hizo mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección de fluorescencia, con las mismas condiciones de trabajo utilizadas en la sección 1.3.3.2 (pag. 62).

La presencia de B(a)P, fue confirmada mediante la realización en HPLC-FL de espectros de emisión y espectros en modo sincron utilizando las mismas condiciones que en la sección 1.3.4 (pag. 62)

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1. EXTRACCIÓN

La extracción del eluato hexánico, donde se encuentra el AHLL, con DMSO permite la separación del B(a)P de los componentes lipídicos, que representan una gran interferencia para el análisis posterior.

Al no haber problemas de formación de emulsiones por ser matrices más sencillas que los alimentos, pudieron utilizarse volúmenes de DMSO mucho más pequeños (5, 3 y 2 mL) que los usados en la etapa de purificación del extracto hexánico obtenido tras la extracción de aquellos mediante ultrasonidos (15, 10 y 5 mL).

2.2. PURIFICACIÓN

En la sección 2.2.3 (pag. 68) se optimizó la proporción de DMSO:agua (1:2.4) apropiada para que todo el B(a)P quedase retenido en la minicolumna C-18, por ello, a los 10 mL de DMSO se le añadieron 24 mL de agua MILLI-Q, y se pasaron a través de la minicolumna, eluyéndose posteriormente el analito con 5 mL de n-hexano.

Sin embargo al ser muy coloreado el extracto obtenido, no fue posible pasar directamente al análisis cromatográfico. Para solucionar este problema se probaron solventes de elución menos apolares que el n-hexano, con el fin de arrastrar menor cantidad de impurezas. Se realizaron ensayos con ACN, acetona y metanol, no consiguiendo resultados satisfactorios.

Por ello, se optó por eluir con n-hexano y a continuación purificar dicho eluato a través de una Sep Pak sílica Plus (sección 2.2.1, pags. 66 y 67), obteniéndose 15 mL de extracto hexánico. Esta solución se concentra a sequedad bajo corriente de nitrógeno, y se redisuelve en 1 mL de ACN, que después de ser filtrado (filtros MFS-25, con tamaño de poro 0.5 μ m), es inyectado directamente en el cromatógrafo de líquidos.

2.3. ANÁLISIS Y CONFIRMACIÓN

El análisis del B(a)P así como su confirmación se realizaron por HPLC-FL, en las mismas condiciones que las recogidas en el apartado 2.3.2 (pag. 73) y 2.6 (pags. 79 y 81). En las figuras 32 y 33 se comparan los cromatogramas y los espectros de una solución estándar de B(a)P, y de una muestra de AHLL comercial.

2.4. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Los límites de detección y de cuantificación para el B(a)P en el eluato de ACN, ya calculados en el apartado 2.4, son 0.049 y 0.089 $\mu\text{g/L}$, respectivamente; equivalentes a 0.024 y 0.045 μg de B(a)P/Kg de humo (considerando que partimos de 2 g de AHLL y obtenemos un volumen final de 1 mL de ACN). Este límite de cuantificación es considerablemente más bajo que el nivel máximo fijado por la FAO/OMS, de 10 $\mu\text{g/Kg}$.

2.5. CUANTIFICACIÓN Y LINEARIDAD DE LA RESPUESTA

Las concentraciones de B(a)P en las muestras se determinaron a partir de la recta de calibrado calculada en la sección 2.5 (pag. 79)

$$\text{Area} = 1572819 [\text{ }] - 0.0333 \quad (r = 0.9999) \quad (\text{rango } 0.25\text{-}16 \mu\text{g/L})$$

La concentración en $\mu\text{g/Kg}$ de B(a)P en el AHLL se calculó dividiendo la concentración en $\mu\text{g/L}$ del B(a)P en el eluato de ACN, por el peso, en gramos, de la muestra de aroma de humo.

2.6. PRECISIÓN Y RECUPERACIÓN

La precisión del método se ha calculado sometiendo al procedimiento experimental descrito, seis muestras de un humo líquido liposoluble comercial, obteniéndose una media de 0.29 μg de B(a)P/Kg de humo y una precisión (RSD) de 3.13. (Tabla XXI).

La recuperación se ha calculado como la media de las recuperaciones obtenidas al sobrecargar seis muestras de este aroma con B(a)P a dos niveles de concentración (5 y 15 $\mu\text{g/Kg}$). En la Tabla XXI se muestran los resultados obtenidos.

MUESTRA DE HUMO LÍQUIDO LIPOSOLUBLE

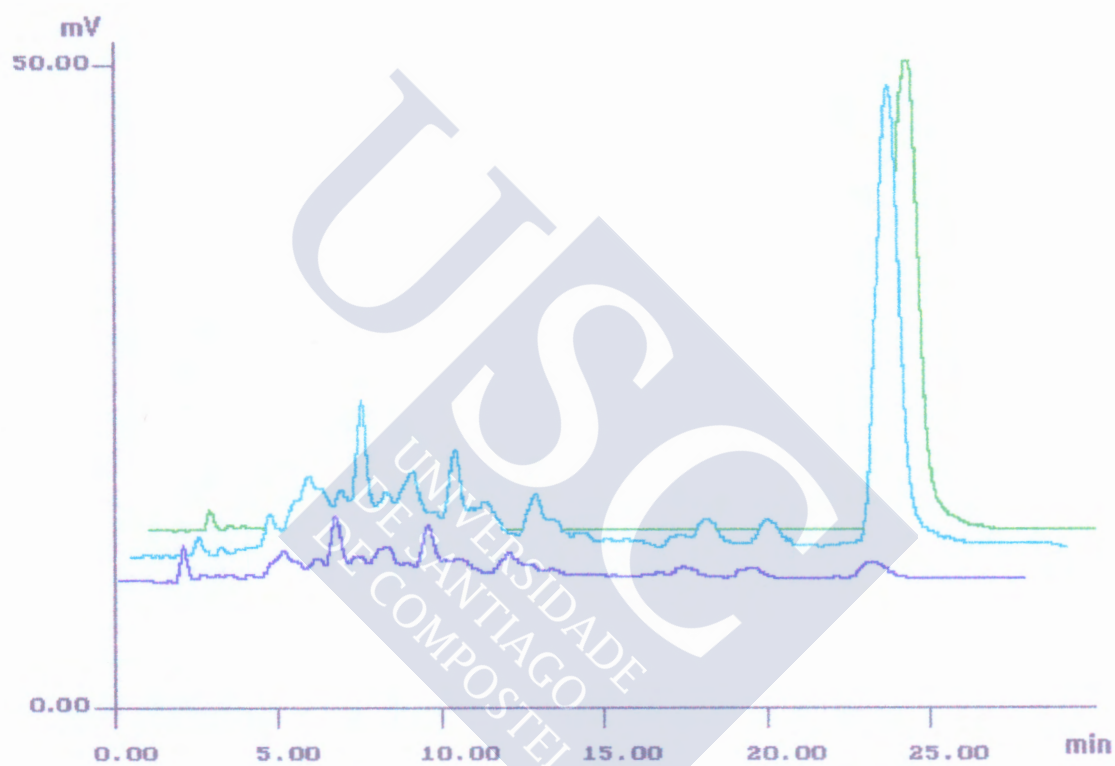
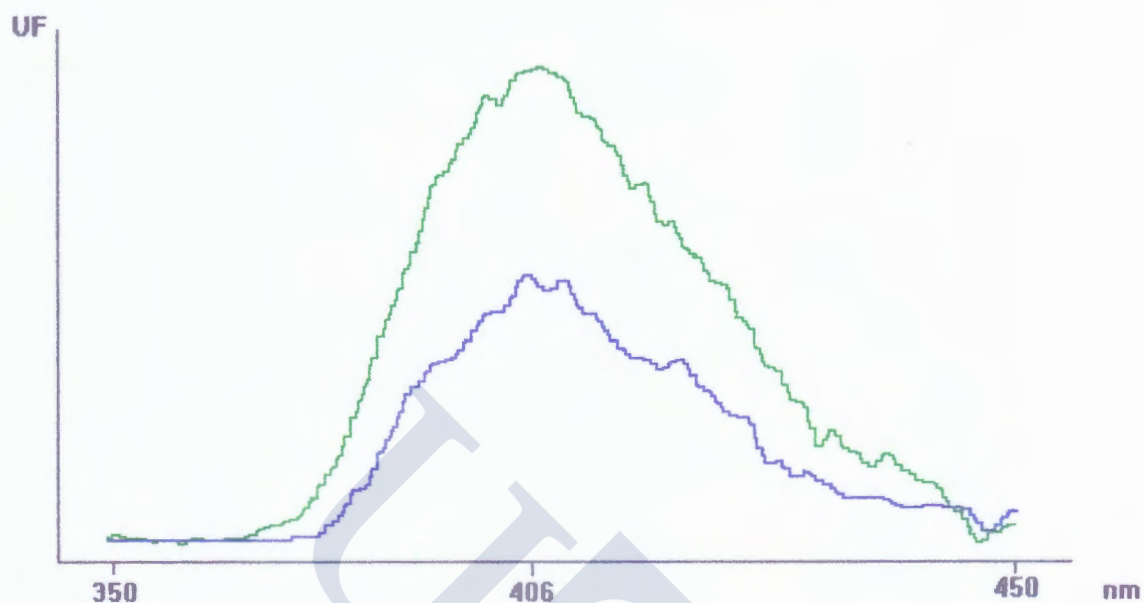
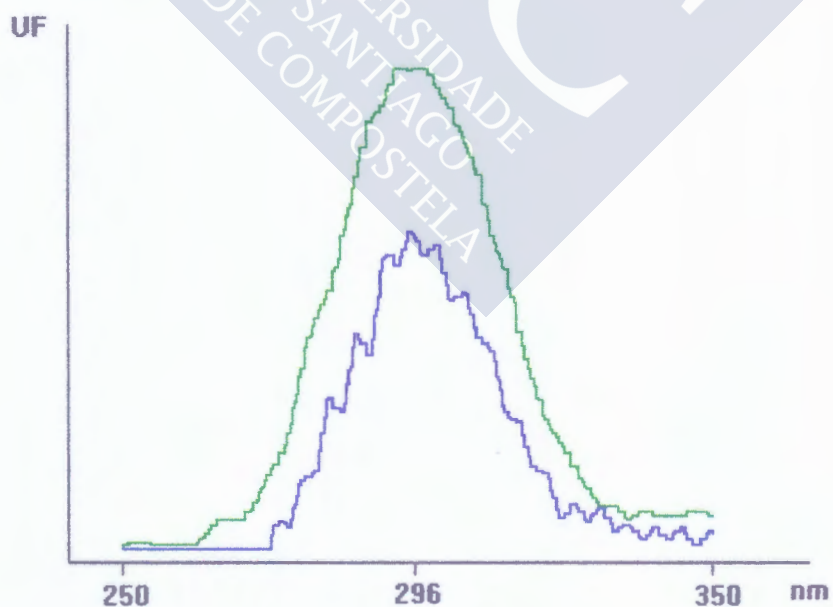


Figura 32: Cromatogramas de 10 $\mu\text{g/L}$ de benzo(a)pireno en ACN (verde), de la muestra de humo líquido liposoluble (azul) y de la misma muestra sobrecargada con 5 $\mu\text{g/kg}$ de benzo(a)pireno (azul claro) ($\lambda_{\text{exc.}}=296\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}}=406\text{ nm}$)

MUESTRA DE HUMO LÍQUIDO LIPOSOLUBLE

Espectros de emisión 3 $\mu\text{g/L}$ de benzo(a)pireno en ACN (verde) y de la muestra de humo líquido liposoluble (azul), realizados mediante HPLC-FL



Espectros sincrónicos de 3 $\mu\text{g/L}$ de benzo(a)pireno en ACN (verde) y de la muestra de humo líquido liposoluble (azul), realizados mediante HPLC-FL

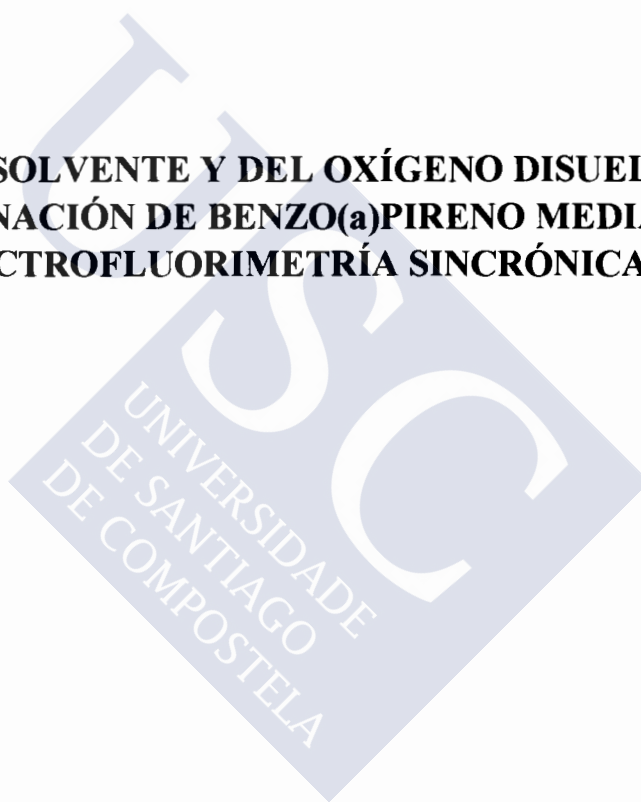
Figura 33

Tabla XXI.-RSD y % R obtenidas al someter seis veces al procedimiento experimental descrito una muestra de aroma de humo lipofílico sobrecargada con benzo(a)pireno

B(a)P añadido ($\mu\text{g/Kg}$)	\bar{X} encontrada ($\mu\text{g/Kg}$)	Precisión (RSD)	Recuperación (%R)
0	0.3	3.13	
5.0	4.6	1.03	87
15.0	13.3	1.50	87



**EFFECTOS DEL SOLVENTE Y DEL OXÍGENO DISUELTO EN LA
DETERMINACIÓN DE BENZO(a)PIRENO MEDIANTE
ESPECTROFLUORIMETRÍA SINCRÓNICA**



1. PROTOCOLO ANALÍTICO

1.1. EFECTO DEL SOLVENTE

Se han analizado los efectos que los siguientes solventes provocan sobre la fluorescencia del B(a)P: acetona, ACN, benceno, cloroformo, diclorometano, DMSO, metanol, n-hexano y tolueno.

Para cada uno de éstos y para las soluciones estándar de B(a)P 8 $\mu\text{g/L}$ en los mismos, se han ensayado 50 intervalos de longitud de onda ($\Delta\lambda$) diferentes, en las siguientes condiciones espectrofluorimétricas:

- rango espectral: 200-500 nm
- velocidad de barrido: 240 nm/min
- rendija de excitación: 5 nm
- rendija de emisión: 5 nm
- intervalo de longitud de onda inicial: 10 nm
- incremento: 5 nm
- n° de registros: 50

Posteriormente se seleccionaron los intervalos de longitud de onda más adecuados para la determinación del B(a)P en cada uno de los solventes, usando para ello gráficas tridimensionales y mapas de contorno. Para la construcción de estas gráficas, se han utilizado dos programas en TURBO-BASIC diseñados en este departamento, que permiten al SURFER (programa comercial creado para la construcción de las representaciones citadas) interpretar los datos procedentes de los ficheros espectrales en ASCII obtenidos con el espectrofluorímetro (LÓPEZ DE ALDA y col., 1994 b).

1.2. EFECTO DEL OXÍGENO DISUELTO

Para los estudios de desoxigenación, cada una de las soluciones anteriores es transferida a la cubeta espectrofluorimétrica y borboteada con nitrógeno gas con un flujo de 0.83 mL/seg durante dos minutos. Inmediatamente después, y con la cubeta perfectamente cerrada se realizan los espectros de fluorescencia óptimos, previamente determinados, para cada una de las soluciones estándar de B(a)P en los diferentes solventes.

1.3. ESTUDIO DE LA FOTODEGRADACIÓN DEL B(A)P EN SOLUCIÓN

Se prepararon soluciones estándar de B(a)P 4 $\mu\text{g/L}$ en los nueve solventes objeto de estudio, realizando inmediatamente después de su elaboración, los espectros de fluorescencia previamente seleccionados para cada uno de ellos.

Estas soluciones se mantuvieron a temperatura ambiente y sin proteger de la luz, estudiando las variaciones de la fluorescencia a diferentes intervalos de tiempo (0, 2, 5, 14, 20 y 26 horas).

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1. EFECTO DEL SOLVENTE

Uno de los inconvenientes que presenta la espectrofluorimetría en relación con su gran sensibilidad, es el de las impurezas (APHA, 1992). El empleo de solventes con un grado de pureza baja, conduce a espectros no planares con bandas Raman más acentuadas, y picos más o menos anchos de identidad desconocida que dificultan la obtención de datos precisos y exactos (LLOYD, 1977). Por ello, inicialmente se comprobó la transparencia y ausencia de interferencias de cada uno de los solventes estudiados mediante la realización de espectros tridimensionales y mapas de contorno; algunos de estos solventes (dimetilsulfóxido, n-hexano y metanol) ya habían sido estudiados anteriormente (LÓPEZ DE ALDA y col., 1994 a). En las figuras 34, 35 y 36 se muestran los espectros tridimensionales y los mapas de contorno del DMSO, ACN y n-hexano.

La validez o satisfactoriedad de cualquier método analítico que incluya la espectrofluorimetría como técnica de identificación y cuantificación, depende en gran medida del solvente utilizado (ACREE y col., 1990 a; TACHIBANA y col., 1988), debiendo éste cumplir una serie de requisitos como son: grado de pureza, transparencia o ausencia de interferencias de tipo bandas Raman o Rayleigh, etc y aportar, dentro de lo posible, ciertas ventajas como son: mantener estable al analito, incrementar su fluorescencia, etc.

Muchos han sido los trabajos publicados en los que se estudia el efecto de la polaridad del solvente sobre la fluorescencia de diferentes PAH (especialmente el pireno y sus derivados). Los espectros de emisión de los PAH, están compuestos de diferentes bandas de vibración, denominadas I, II, III ..., en orden progresivo. La intensidad de

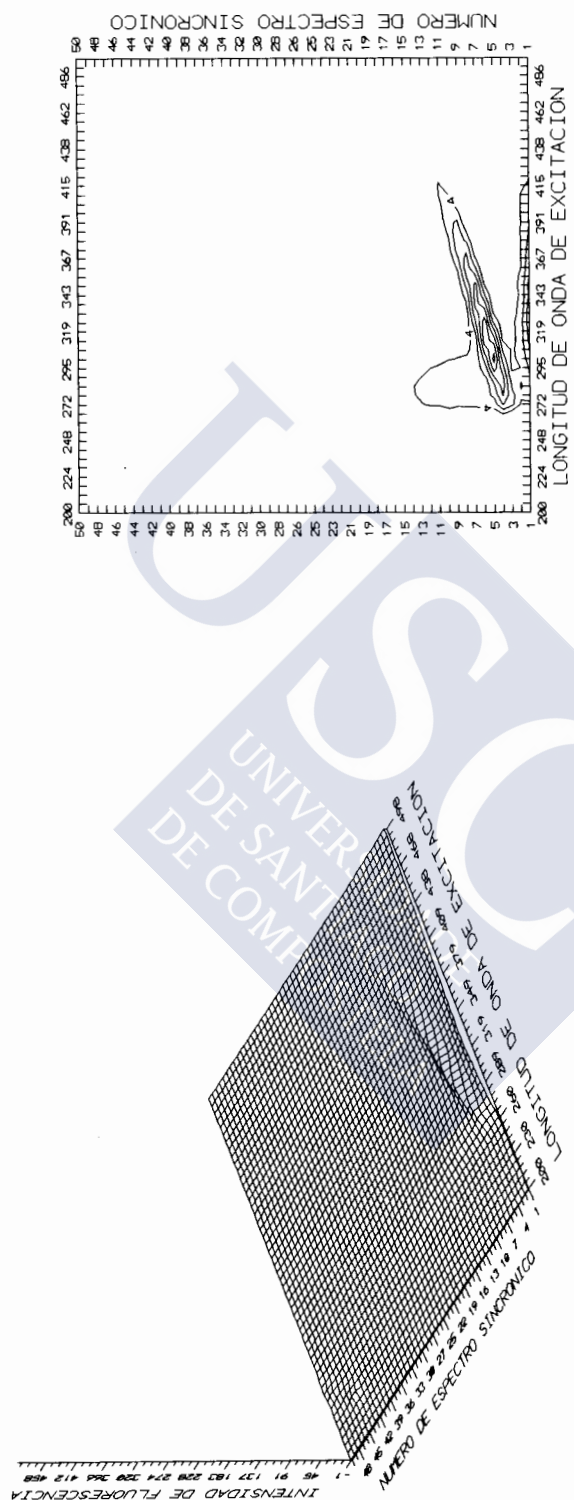


Figura 34.- Diagrama tridimensional y mapa de contorno del DMSO

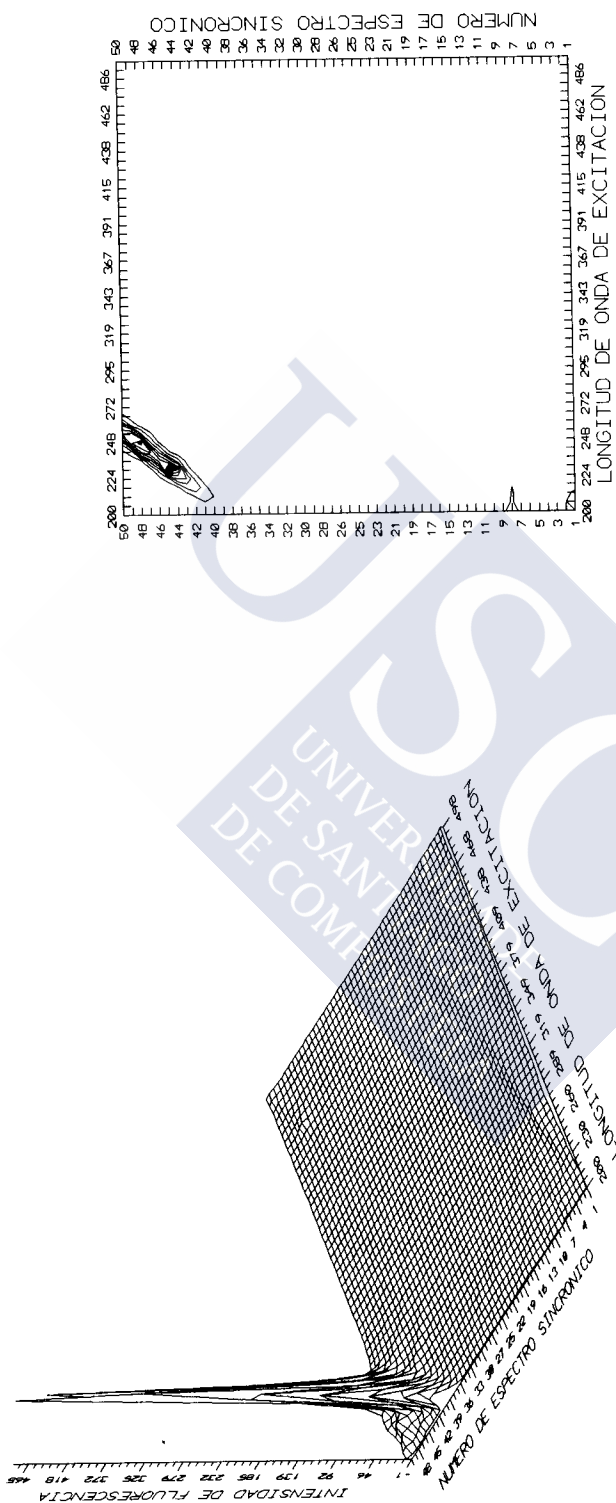


Figura 35- Diagrama tridimensional y mapa de contorno del ACN

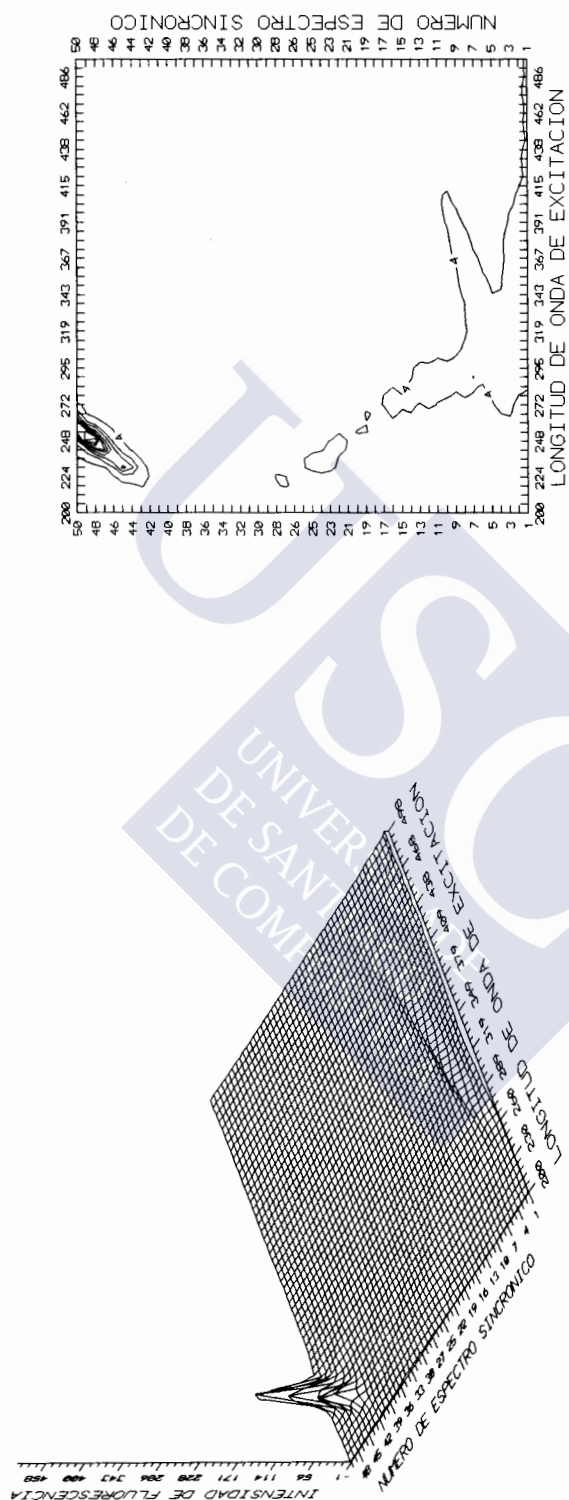


Figura 36.- Diagrama tridimensional y mapa de contorno del n-hexano

cada una de estas bandas depende considerablemente del solvente en el que se encuentre el analito. Se observó, que en determinados PAH como el pireno, ovaleno, benzo(g,h,i)perileno, coroneno, benzo(a)coroneno, dibenzo(a,j)coroneno, nafto(2,3, a)coroneno y benzo(e)pireno, la intensidad de la banda de vibración I del espectro de emisión aumentaba, en función de la polaridad del solvente, permaneciendo en cambio constante la intensidad de la banda III (o banda IV en el caso del benzo(e)pireno y banda I en el dibenzo(a,j)coroneno). Esta propiedad de los PAH denominados "no alternantes" ha sido utilizada como medida cuantitativa de la polaridad de diferentes solventes (WARIS y col., 1988; ACREE y col., 1990 a y b; TUCKER y col., 1989, 1990 y 1991). En el caso del B(a)P, y del resto de los PAH incluidos en el grupo de "alternantes", la relación entre las bandas I y IV, permanece constante independientemente del solvente.

Por otro lado, la selección del intervalo de longitud de onda ($\Delta\lambda$) es, probablemente el parámetro más importante para la aplicación con éxito de la espectrofluorimetría sincrónica (INMAN y col., 1982 b). El espectro tipo sincron presenta, en general, una mayor simplicidad que el espectro normal, con bandas más estrechas y mejor definidas. Sin embargo, la amplitud de las mismas está determinada en gran medida por el valor que toma el intervalo.

En la elección del $\Delta\lambda$ óptimo para el análisis del B(a)P con cada uno de los solventes (Tabla XXII), han resultado de gran utilidad, tal y como se ha apuntado en numerosas ocasiones en la literatura (VO-DINH, 1978; WEINER, 1978; INMAN y col., 1982 a y b; WEI-XI y col., 1993), las gráficas tridimensionales y, fundamentalmente, los mapas de contorno (Figuras 37, 38 y 39).

En la tabla XXII se observa que los $\Delta\lambda$ óptimos son 20 y 110 nm para la mayor parte de los disolventes, excepto para el metanol que son 25 y 110 nm y para el tolueno que son 20 y 100 nm. En el caso de la acetona sólo se encontró una respuesta óptima con un $\Delta\lambda$ de 20 nm, ya que este solvente es opaco en la zona ultravioleta.

La longitud de onda de excitación a la que se obtiene la máxima respuesta, para un mismo $\Delta\lambda$ varía en función del disolvente (Tabla XXII), observándose desplazamientos de hasta 5 nm (384/389) cuando el $\Delta\lambda$ es 20 y de 4 nm (295/299) para un $\Delta\lambda$ de 110 nm (Figuras 40 a 45).

Tabla XXII.- Espectros sincrónicos óptimos y longitudes de onda de excitación máxima obtenidos para el benzo(a)pireno en los nueve solventes objeto de estudio

Solvente	$\Delta\lambda$	$\lambda_{exc.}$ de máxima respuesta (nm)
DMSO	20	389
	110	299
Acetona	20	385
Metanol	25	380.5
	110	295.5
Acetonitrilo	20	386
	110	297
Benceno	20	387.5
	110	298.5
Diclorometano	20	387
	110	298
Cloroformo	20	387.5
	110	298.5
Tolueno	20	387.5
	100	301.5
n-Hexano	20	384
	110	295

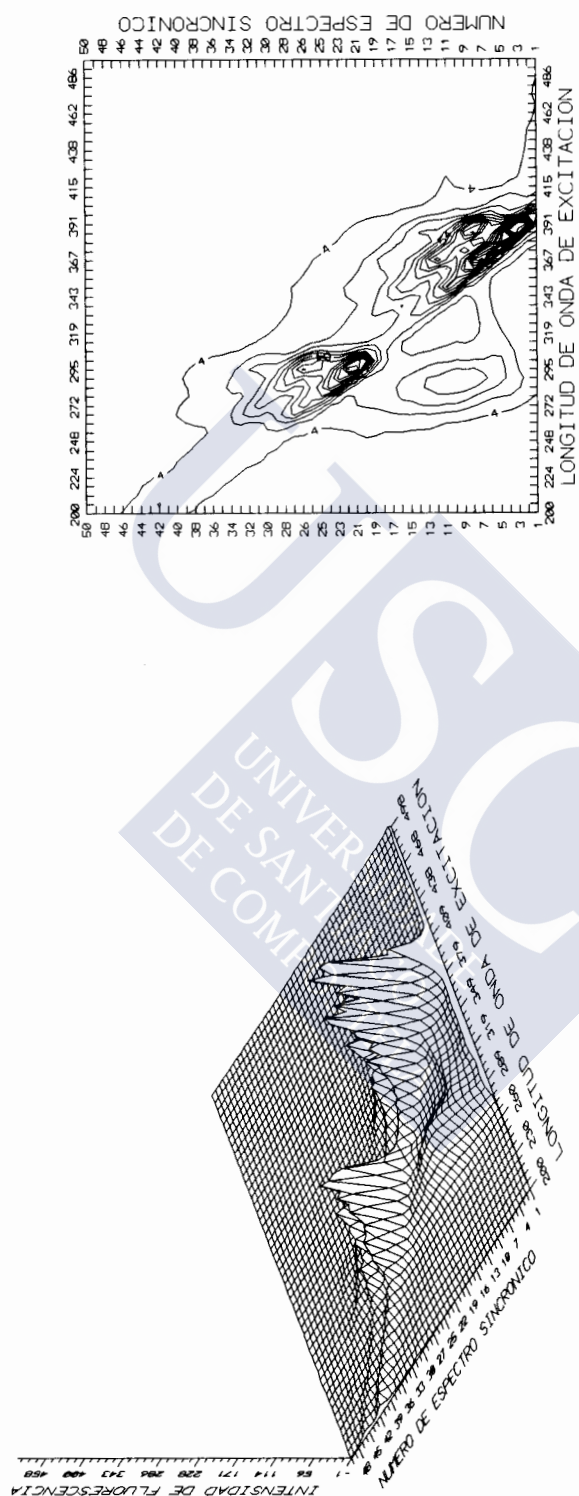


Figura 37.- Diagrama tridimensional y mapa de contorno de benzo(a)pireno en DMSO

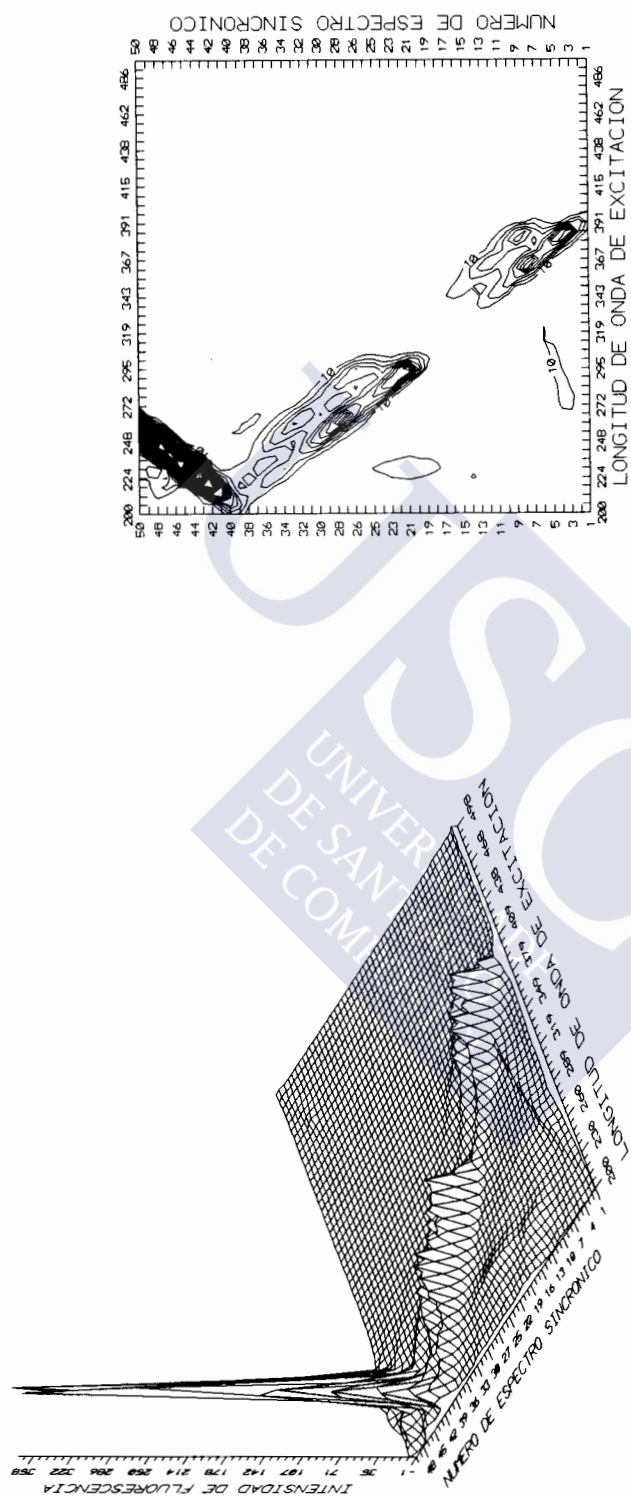


Figura 38.- Diagrama tridimensional y mapa de contorno de benzo(a)pireno en ACN

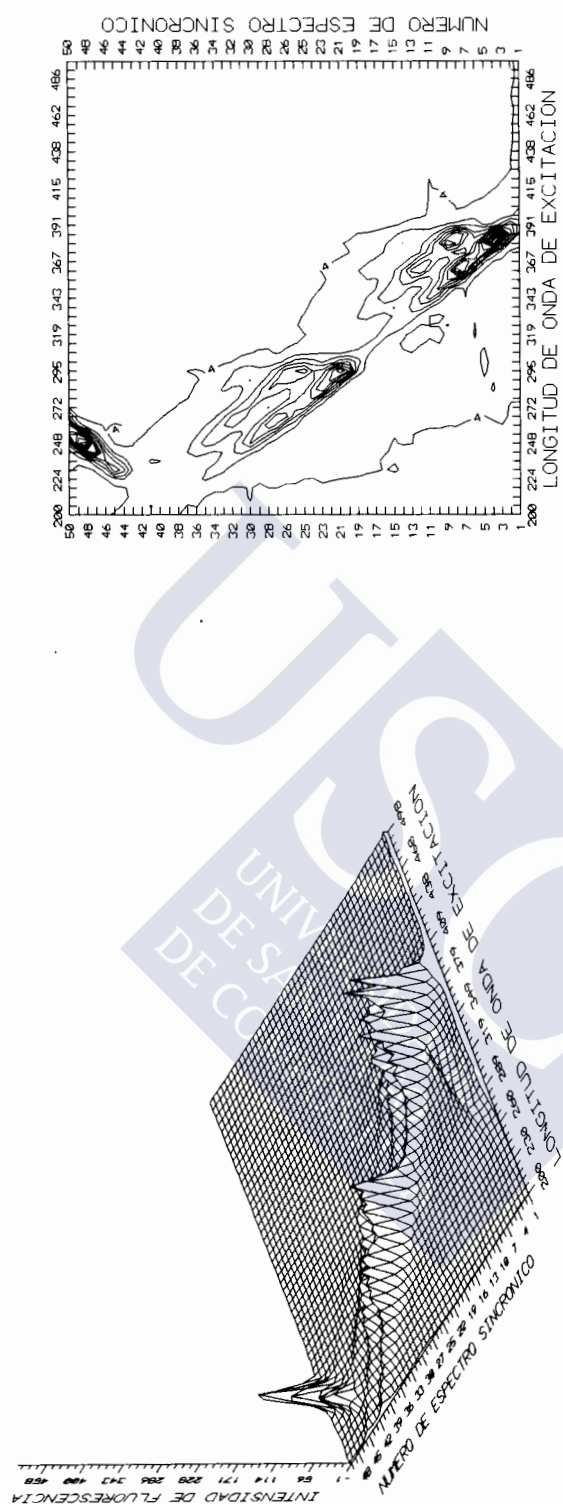


Figura 39.- Diagrama tridimensional y mapa de contorno de benzo(a)pireno en n-hexano

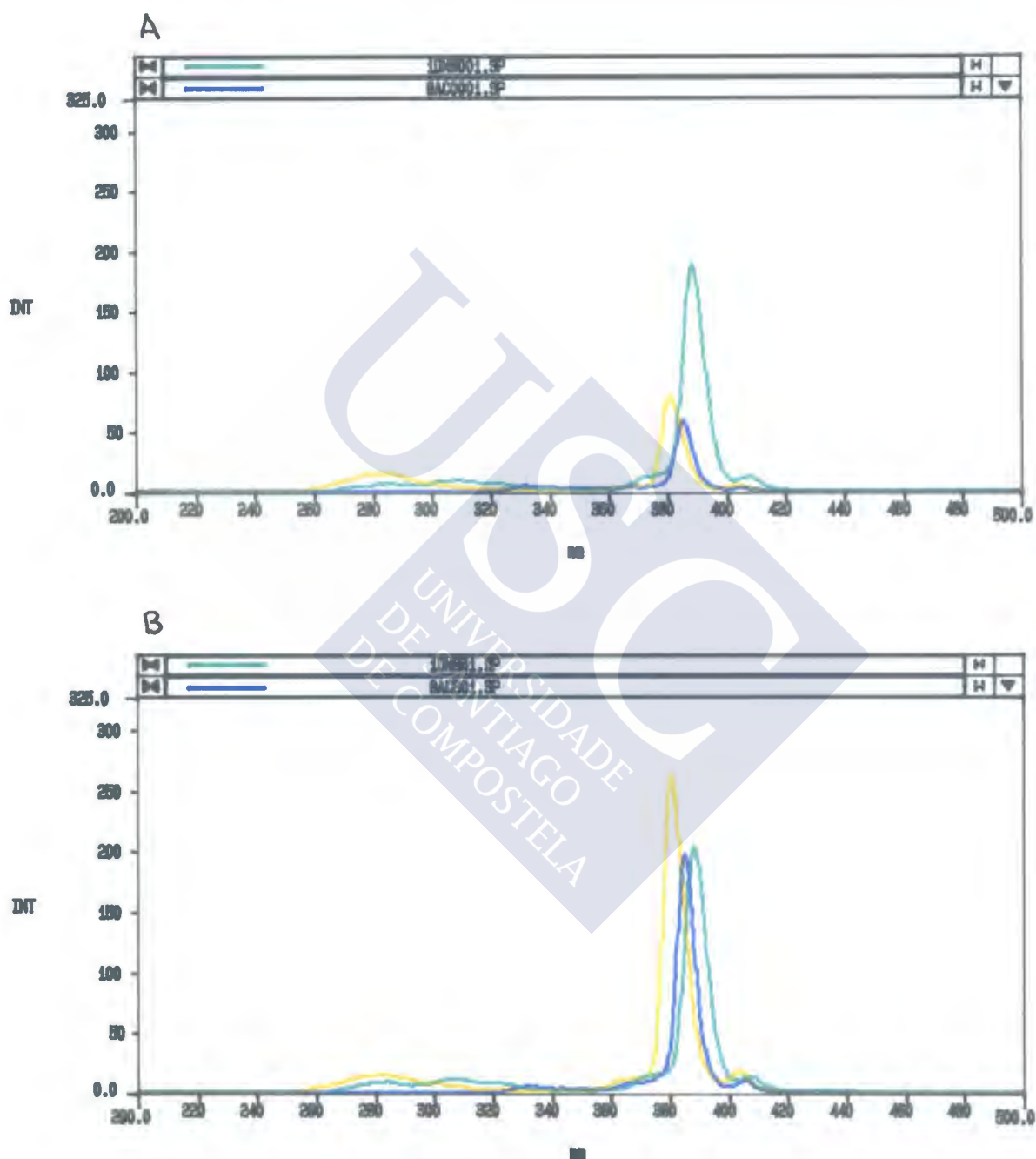


Figura 40.- Espectros de fluorescencia sincrónicos de 8 $\mu\text{g/L}$ de benzo(a)pireno en DMSO ($\Delta\lambda = 20 \text{ nm}$) (verde), acetona ($\Delta\lambda = 20 \text{ nm}$) (azul) y metanol ($\Delta\lambda = 25 \text{ nm}$) (amarillo), antes (A) y después (B) del borboteo con nitrógeno

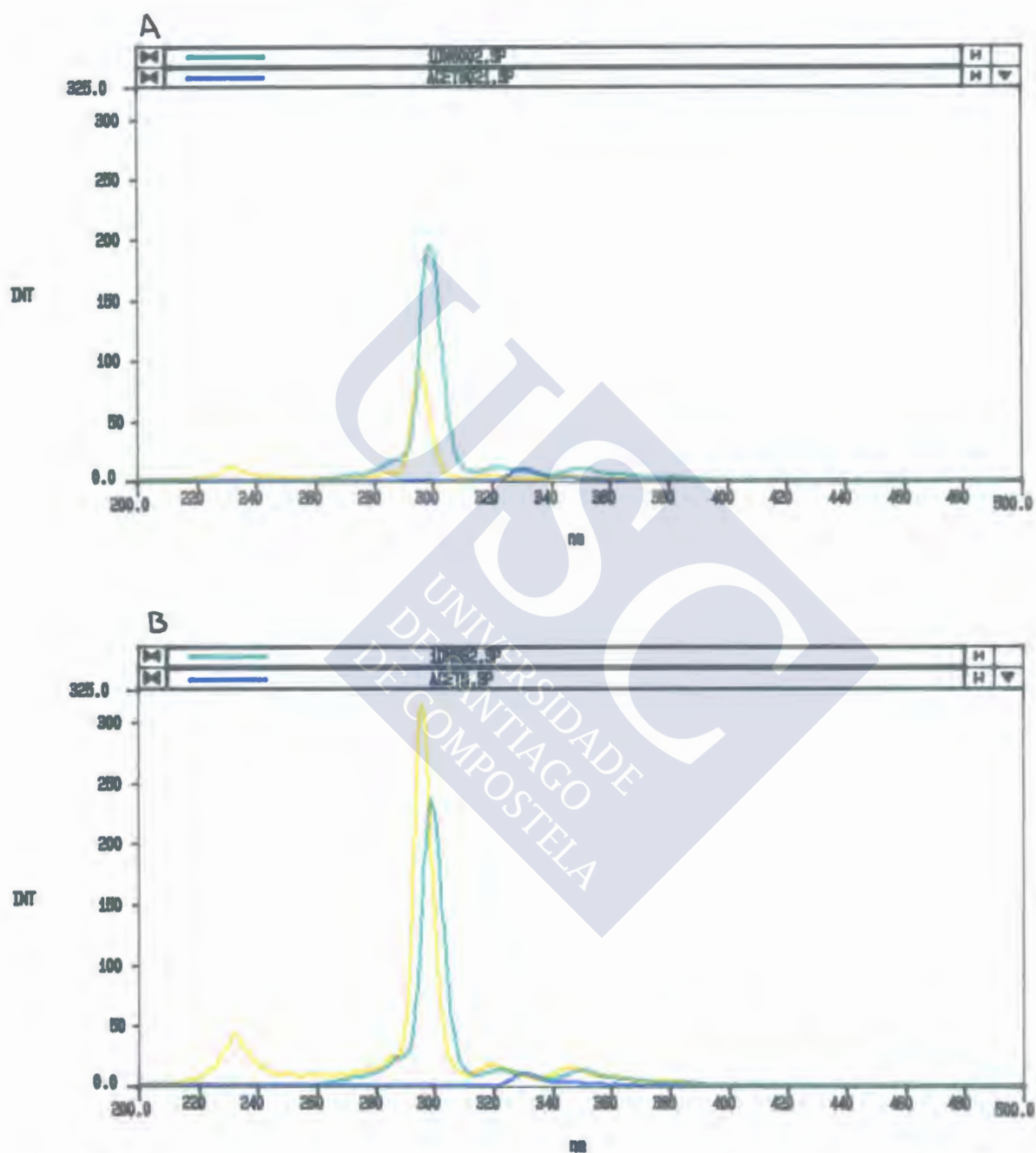


Figura 41.- Espectros de fluorescencia sincrónicos de 8 µg/L de benzo(a)pireno en DMSO (verde), acetona (azul) y metanol (amarillo), antes (A) y después (B) del borboteo con nitrógeno ($\Delta\lambda = 110$ nm)

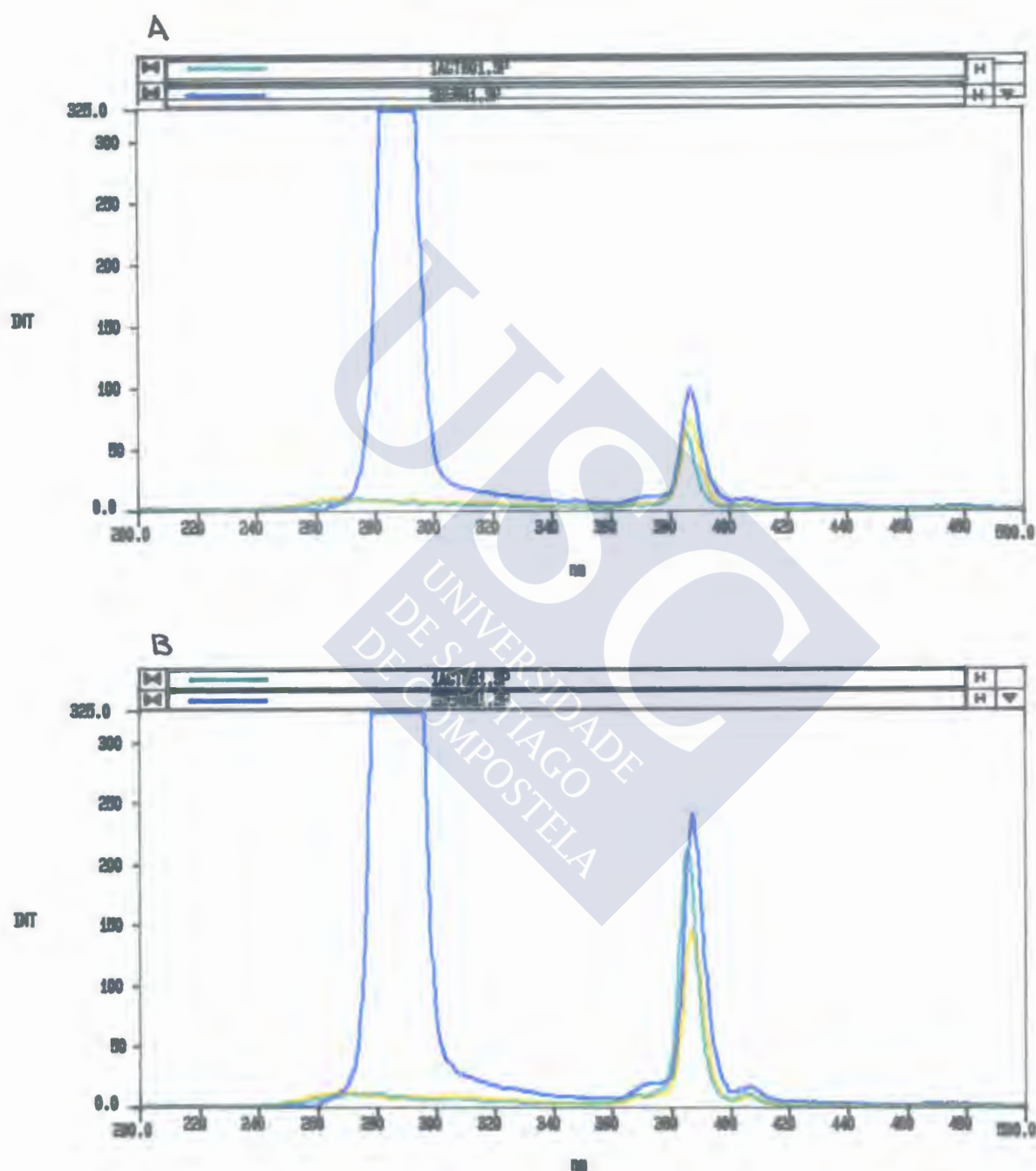


Figura 42.- Espectros de fluorescencia sincrónicos de 8 µg/L de benzo(a)pireno en ACN (verde), benceno (azul) y diclorometano (amarillo), antes (A) y después (B) del borboteo con nitrógeno ($\Delta\lambda = 20$ nm)

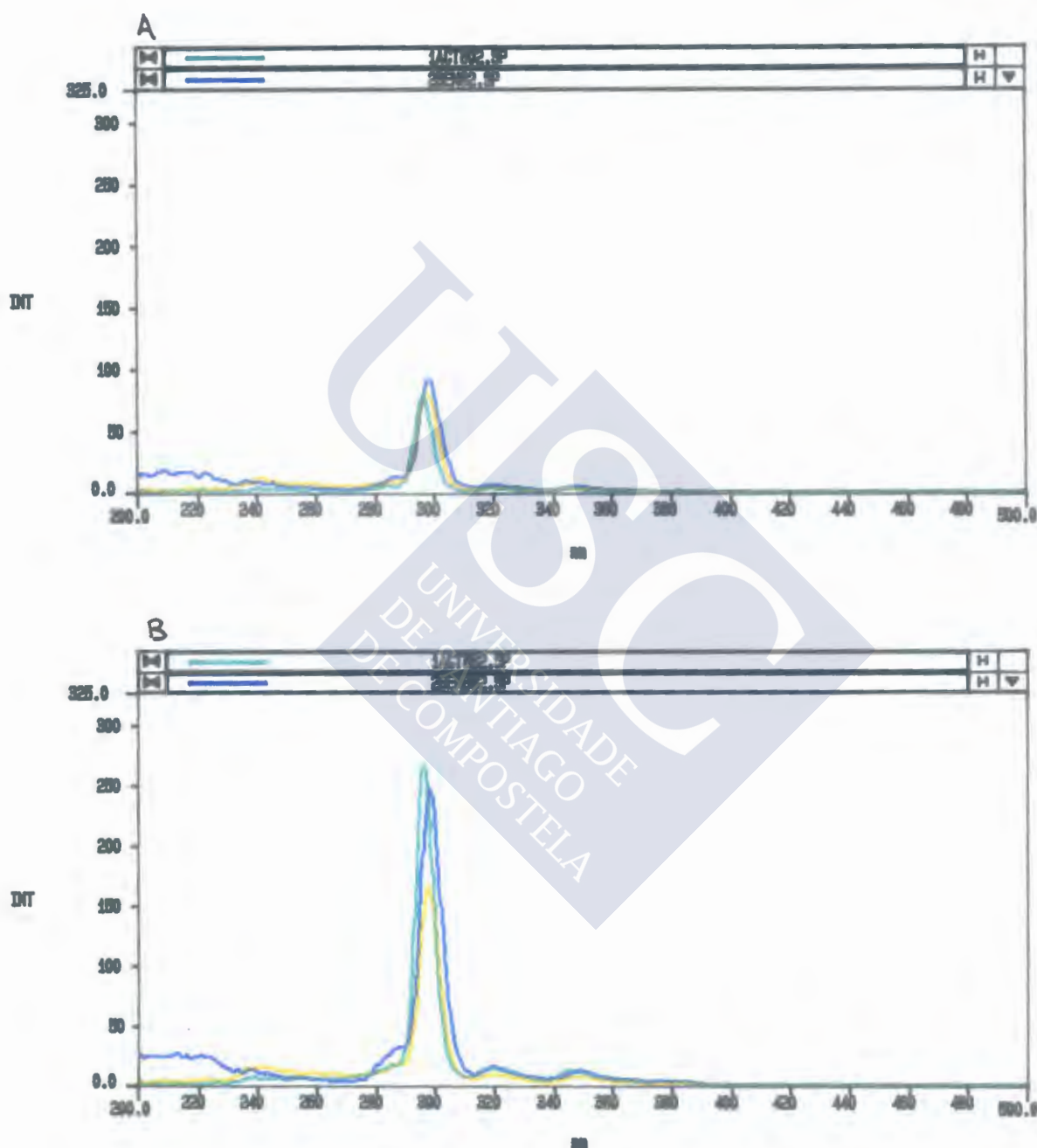


Figura 43.- Espectros de fluorescencia sincrónicos de 8 $\mu\text{g/L}$ de benzo(a)pireno en ACN (verde), benceno (azul) y diclorometano (amarillo), antes (A) y después (B) del borboteo con nitrógeno ($\Delta\lambda = 110 \text{ nm}$)

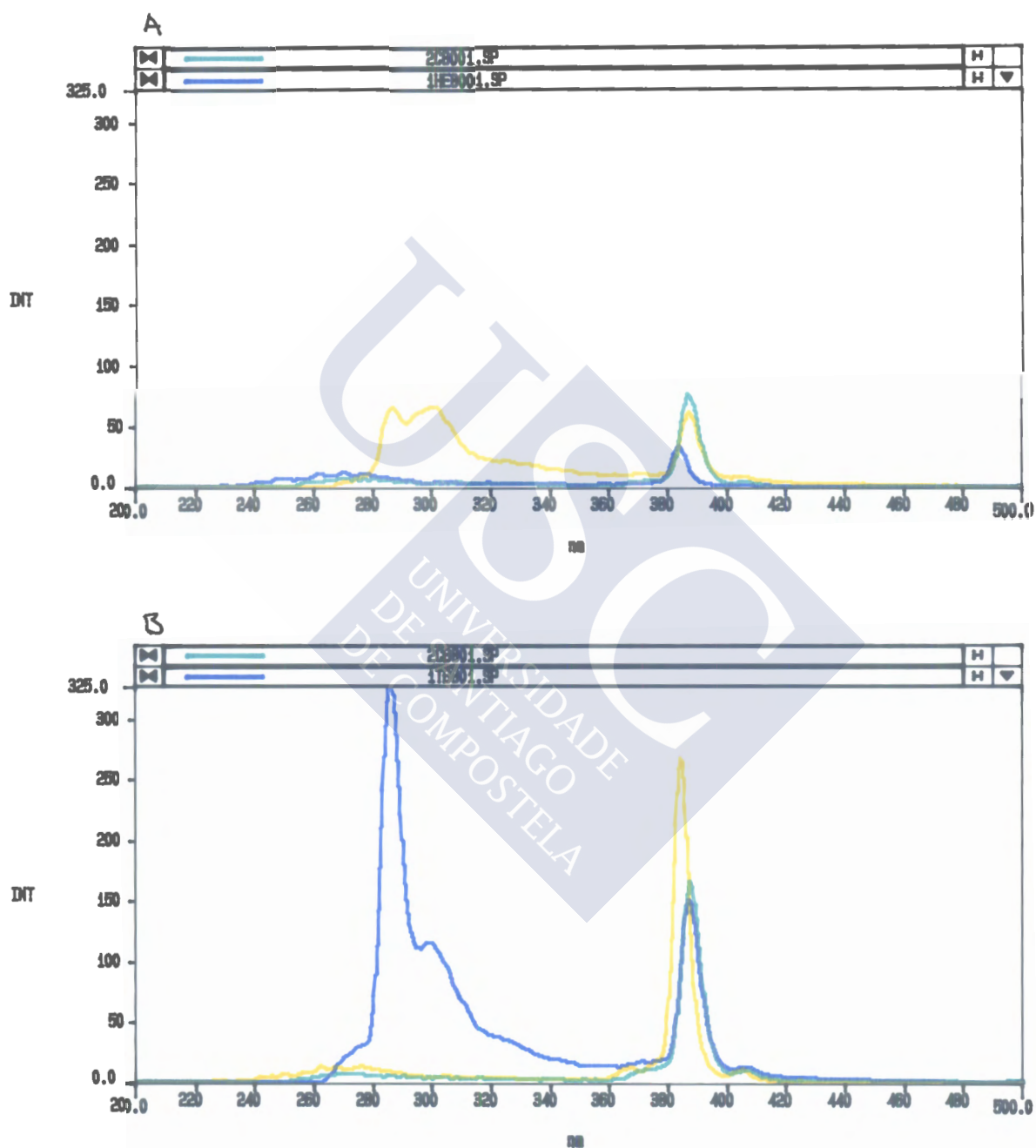


Figura 44.- Espectros de fluorescencia sincrónicos de 8 $\mu\text{g/L}$ de benzo(a)pireno en cloroformo (verde), tolueno (azul) y n-hexano (amarillo), antes (A) y después (B) del borboteo con nitrógeno ($\Delta\lambda = 20 \text{ nm}$)

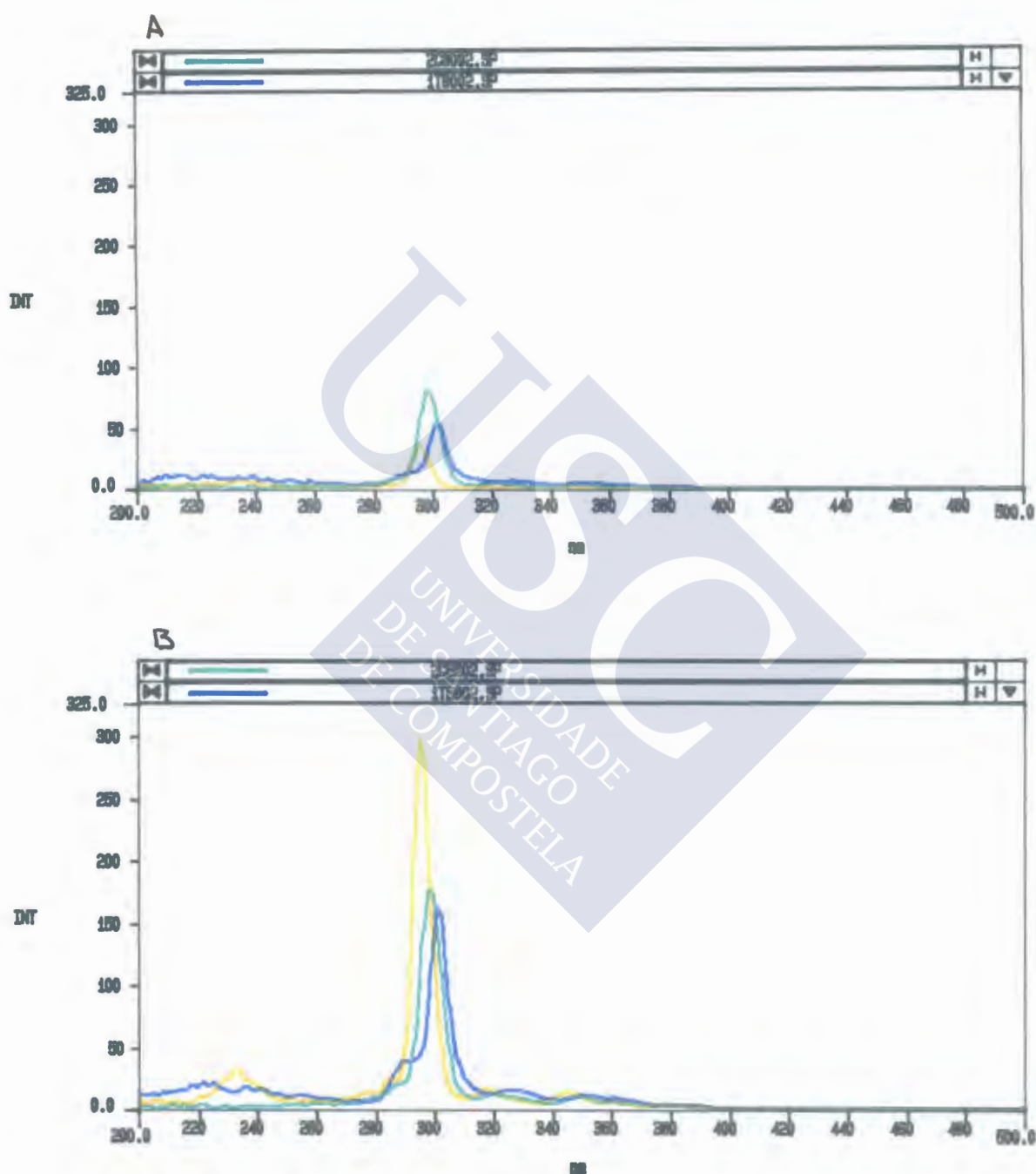


Figura 45.- Espectros de fluorescencia sincrónicos de 8 µg/L de benzo(a)pireno en cloroformo ($\Delta\lambda = 110$ nm) (verde), tolueno ($\Delta\lambda = 100$ nm) (azul) y n-hexano ($\Delta\lambda = 110$ nm) (amarillo), antes (A) y después (B) del borboteo con nitrógeno

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LQ), calculados de acuerdo con las normas de la ACS (1980), se recogen en la Tabla XXIII.

Se calcularon las rectas de calibrado del B(a)P en cada uno de los $\Delta\lambda$ óptimos seleccionados (Tabla XXIV), mediante análisis de regresión de las concentraciones de los patrones de B(a)P, medidas por triplicado, frente a las alturas de los picos con línea base (ACS, 1980). Bajo cualquiera de las condiciones ensayadas la respuesta instrumental es lineal.

2.2. EFECTO DEL OXÍGENO DISUELTO

Tal vez uno de los más comunes "quenchadores" de la fluorescencia y fosforescencia sea el oxígeno molecular. En soluciones líquidas el "quenching" de moléculas orgánicas por el O_2 disuelto es muy eficaz, y dependiendo del solvente del que se trate, el "quenching" puede llegar a constituir un serio problema analítico (TUCKER, 1990).

Se determinó el tiempo y el flujo de borboteo con nitrógeno necesario para la eliminación total del oxígeno de la solución, realizando barridos a cortos intervalos de tiempo hasta que no se observaron incrementos en la intensidad de fluorescencia, comprobándose que la desoxigenación es completa con un flujo de 0.83 mL/seg durante 2 min. Se comprobó asimismo, que en estas condiciones no se concentraban las soluciones por evaporación del solvente, ya que al oxigenarse nuevamente la muestra, la intensidad de fluorescencia obtenida volvía a ser exactamente igual que antes del borboteo con nitrógeno.

Se calcularon los LD, LQ y las rectas de calibrado, para el B(a)P en cada uno de los solventes previamente desoxigenados con nitrógeno de la misma forma que anteriormente (Tablas XXIII y XXIV). Cumpliéndose, igualmente, que bajo cualquiera de las condiciones ensayadas la respuesta instrumental es lineal.

Al someter a borboteo las soluciones de B(a)P en benceno ($\Delta\lambda$ 110) y tolueno ($\Delta\lambda$ 100 nm), se observó la aparición de bandas de naturaleza desconocida que se solapaban con la señal del B(a)P, haciendo imposible su correcta cuantificación. Estas interferencias probablemente se deban a impurezas del solvente, cuya fluorescencia pasa desapercibida si la solución no es sometida a desoxigenación. Este problema se podría solucionar restando a estos espectros, los obtenidos tras someter a borboteo el propio solvente.

TABLA XXIII.- Límites de detección y de cuantificación del benzo(a)pireno en los nueve solventes objeto de estudio, en cada uno de los espectros sincrónicos óptimos antes (LD^a y LD^a) y después (LD^b y LQ^b) del borboteo con nitrógeno

Solvente	$\Delta\lambda$	LD ^a	LQ ^a	LD ^b	LQ ^b	LQ ^a /LQ ^b
	nm	$\mu\text{g/L}$	$\mu\text{g/L}$	$\mu\text{g/L}$	$\mu\text{g/L}$	
DMSO	20	0.027	0.09	0.02	0.08	1.13
	110	0.03	0.12	0.02	0.10	1.20
Acetona	20	0.032	0.12	0.008	0.03	4.00
Metanol	25	0.043	0.14	0.014	0.05	2.80
	110	0.044	0.17	0.013	0.05	3.40
Acetonitrilo	20	0.039	0.16	0.01	0.05	3.20
	110	0.058	0.19	0.02	0.05	3.80
Benceno	20	0.04	0.17	0.04	0.14	1.21
	110	0.03	0.13			
Diclorometano	20	0.053	0.18	0.02	0.08	2.25
	110	0.086	0.29	0.04	0.15	1.93
Cloroformo	20	0.12	0.38	0.061	0.18	2.11
	110	0.13	0.44	0.060	0.20	2.20
Tolueno	20	0.14	0.49	0.066	0.22	2.23
	100	0.78	1.99			
n-Hexano	20	0.20	0.65	0.03	0.08	8.10
	110	0.07	0.23	0.009	0.03	7.67

a) Solución oxigenada

b) Solución desoxigenada

TABLA XXIV.- Rectas de calibrado del benzo(a)pireno en los nueve solventes objeto de estudio correspondientes a cada uno de los espectros sincrónicos óptimos, antes (a) y después (b) del borboteo con nitrógeno

Solvente	$\Delta\lambda$	Recta de calibrado ^a		r	Recta de calibrado ^b		r
		UF = A[] + B			UF = A[] + B		
		A	B		A	B	
DMSO	20	21.59	0.079	0.9999	23.56	0.067	0.9999
	110	22.85	-0.455	0.9999	26.81	-0.561	0.9999
Acetona	20	6.24	0.189	0.9999	24.12	-1.007	0.9999
Metanol	25	9.11	-0.432	0.9997	28.19	-0.333	0.9999
	110	10.8	-0.096	0.9996	34.61	-1.402	0.9999
Acetonitrilo	20	7.07	-0.236	0.9998	24.72	-0.849	0.9999
	110	8.77	0.098	0.9997	30.70	-0.869	0.9999
Benceno	20	10.6	0.152	0.9999	25.71	2.127	0.9997
	110	10.2	-0.645	0.9999			
Diclorometano	20	8.55	0.910	0.9990	19.02	0.262	0.9990
	110	10.1	0.913	0.9998	19.96	2.535	
Cloroformo	20	8.48	-0.577	0.9999	18.01	-1.730	0.9996
	110	9.29	-0.395	0.9999	19.92	-2.665	0.9993
Tolueno	20	6.40	-1.251	0.9998	16.4	-1.201	0.9999
	100	5.06	-0.043	0.9999			
N-hexano	20	3.79	0.219	0.9999	29.2	0.967	0.9999
	110	4.08	0.342	0.9999	32.1	-0.707	0.9999

a) Solución oxigenada

b) Solución desoxigenada

A la vista de los resultados se puede concluir que la inhibición de la fluorescencia provocada por el oxígeno disuelto, varía en función del solvente en el que se encuentre el B(a)P, observándose que los LD y LQ llegan a incrementarse hasta prácticamente 8 veces en el caso del B(a)P en n-hexano manteniendo éstos prácticamente constantes en el caso del benceno y del DMSO (Figuras 40 a 45).

2.3. DEGRADACIÓN DEL B(A)P

Es conocido que los PAH (y especialmente el B(a)P) son rápidamente degradados fotoquímicamente, siendo fuertemente reactivos al oxígeno y a la luz (LEBO y col., 1991; TAKATSUKI y col., 1985; THOMAS y col., 1985). Durante el transcurso de este estudio pudimos observar que la sensibilidad del B(a)P a la luz se incrementaba considerablemente cuando el analito se encontraba en solución en determinados solventes.

Para estudiar este fenómeno en detalle, se examinó cómo se modificaba la fluorescencia del B(a)P en función del tiempo, manteniendo las soluciones a temperatura ambiente y expuestas a la luz. Se comprobó así que la fotolabilidad del B(a)P es dependiente del solvente en el que se encuentre. Si se representa mediante rectas de regresión (Figuras 46, 47 y 48) la variación de la fluorescencia del B(a)P frente al tiempo en los solventes estudiados, se obtienen tres tendencias diferentes que se recogen en la siguiente Tabla :

TABLA XXV.- Pendientes y coeficientes de regresión (r) obtenidos al representar la variación de la intensidad de fluorescencia (UF) del benzo(a)pireno en los diferentes solventes, frente al tiempo

Solvente	Pendiente	r
n-Hexano	-0.01	-0.055
ACN	-0.04	-0.247
Benceno	-0.06	-0.465
Tolueno	-0.07	-0.180

TABLA XXV (Continúa)

Solvente	Pendiente	r
Metanol	-0.16	-0.649
DMSO	-0.26	-0.776

TABLA XXV (Continúa)

Solvente	Pendiente	r
Acetona	-0.67	-0.977
Cloroformo	-0.93	-0.952
Diclorometano	-1.06	-0.948

A la vista de los resultados se observa que cuando el B(a)P se encuentra en solución en n-hexano, ACN, benceno o tolueno, las pendientes aunque negativas, son próximas a cero; lo cual indica que la degradación del analito es prácticamente nula. En el caso del metanol y del DMSO, las pendientes se incrementan con respecto a las anteriores, poniendo de manifiesto un aumento en la degradación del B(a)P en función del tiempo. Por último, cuando el analito se encuentra en acetona, cloroformo o diclorometano, las pendientes son mucho mayores, lo que significa una significativa disminución de la fluorescencia en periodos de tiempo cortos.

Para demostrar que realmente este fenómeno era debido a la luz, se repitió la experiencia pero esta vez manteniendo las soluciones en la oscuridad, permaneciendo en este caso las soluciones inalterables.

Este hecho tiene especial relevancia considerando que estos solventes se utilizan comunmente en los largos métodos analíticos de PAH sin tomar ningún tipo de precaución en la mayor parte de los casos, así por ejemplo los métodos propuestos por WILD y col. (1991) y MOTHERSHEAD y col (1992) analizan zanahorias y cangrejos incluyendo ambos una extracción con diclorometano durante 19 y 48 horas respectivamente; SANDELL y col. (1993) y LARSSON y col. (1988) extraen durante varias horas usando el primero una mezcla de acetona:tolueno 1:1 en lodos, y acetona el segundo en alimentos ahumados y cocinados a la parrilla. AL YAKOOB y col. (1994) extraen pescados con metanol:cloroformo (2:3) durante 3 horas...

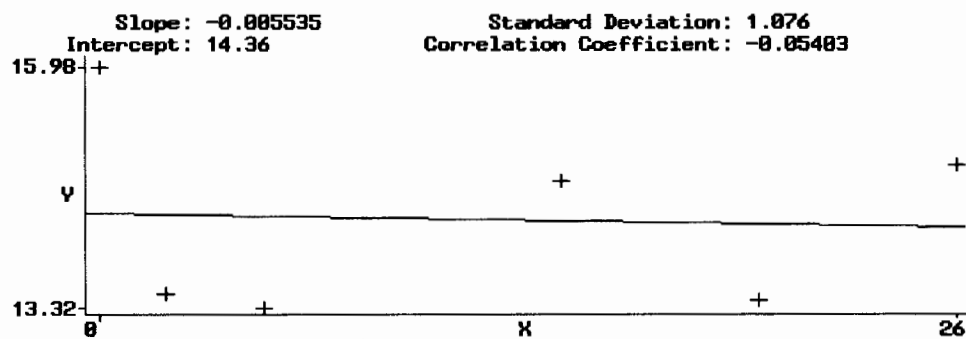
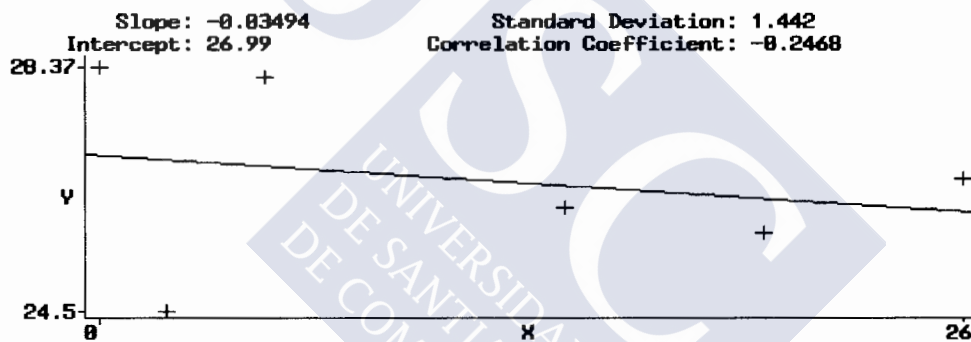
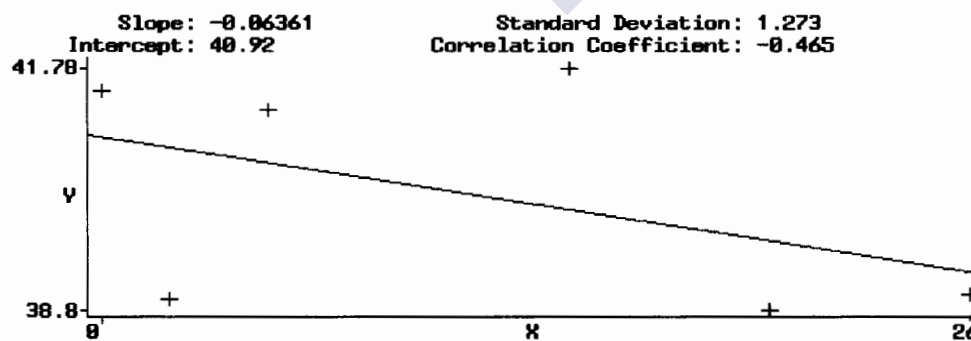
N-HEXANO**ACETONITRILLO****BENCENO**

Figura 46.- Variación de la fluorescencia del benzo(a)pireno frente al tiempo en n-hexano, ACN y benceno

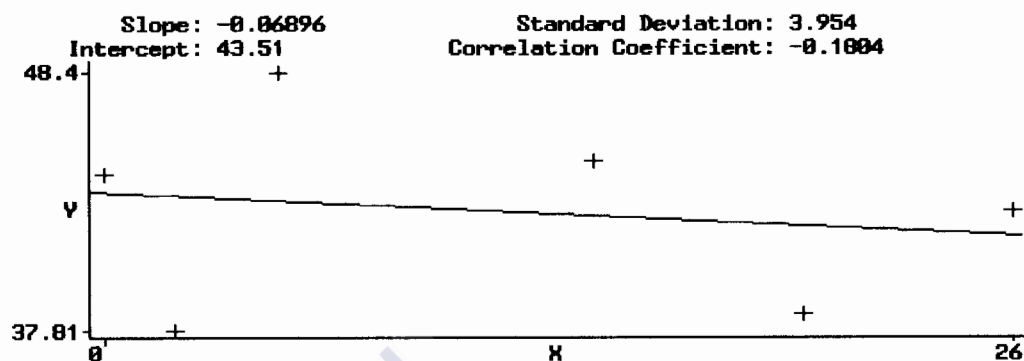
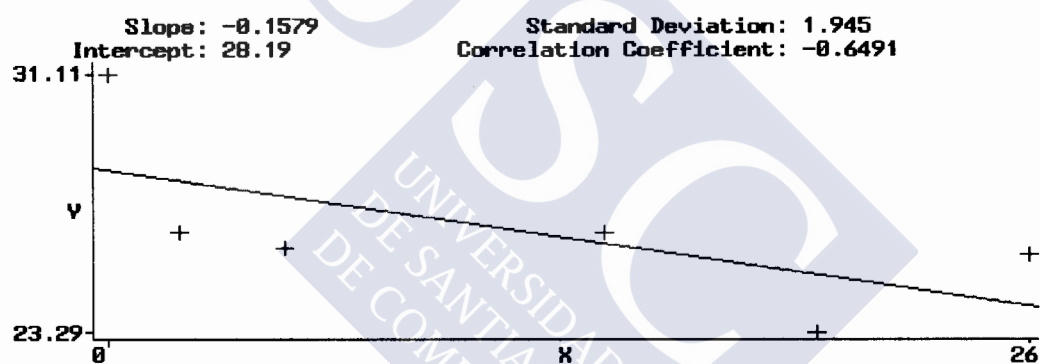
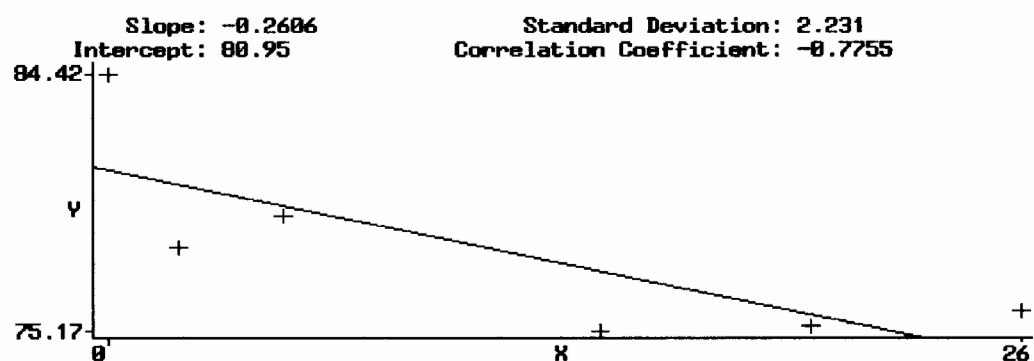
TOLUENO**METANOL****DIMETILSULFÓXIDO**

Figura 47.- Variación de la fluorescencia del benzo(a)pireno frente al tiempo en tolueno, metanol y DMSO

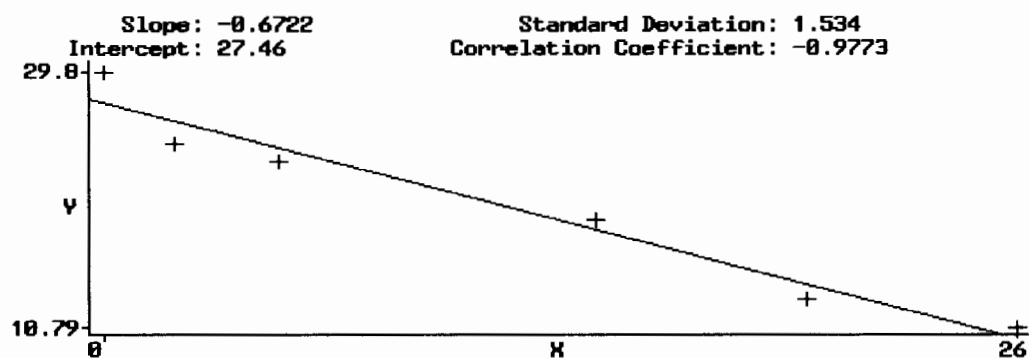
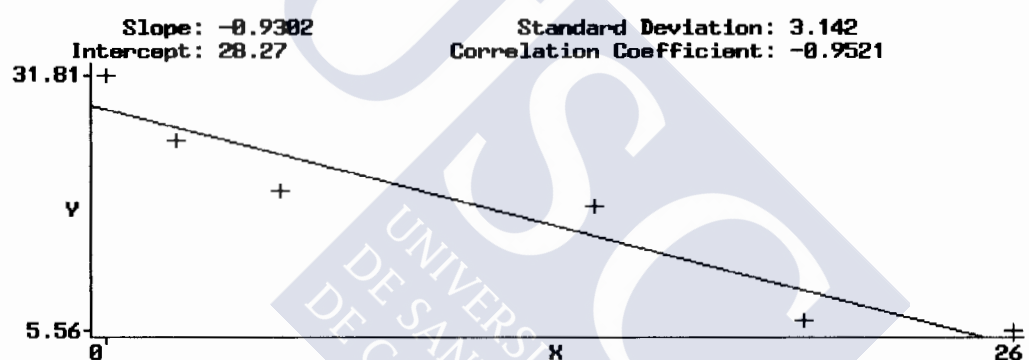
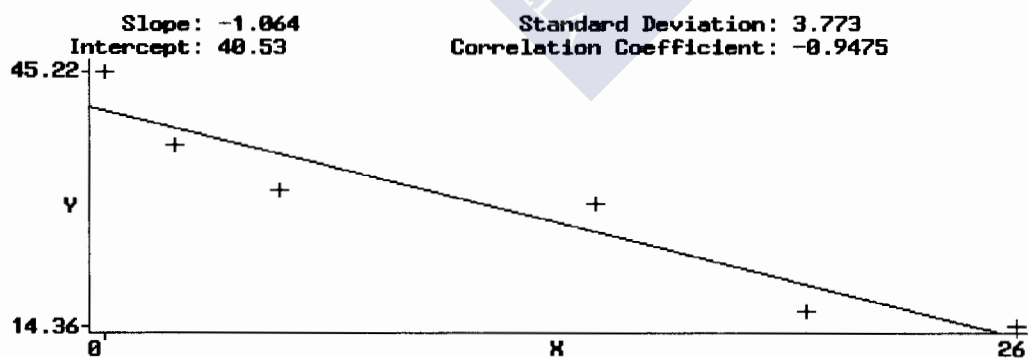
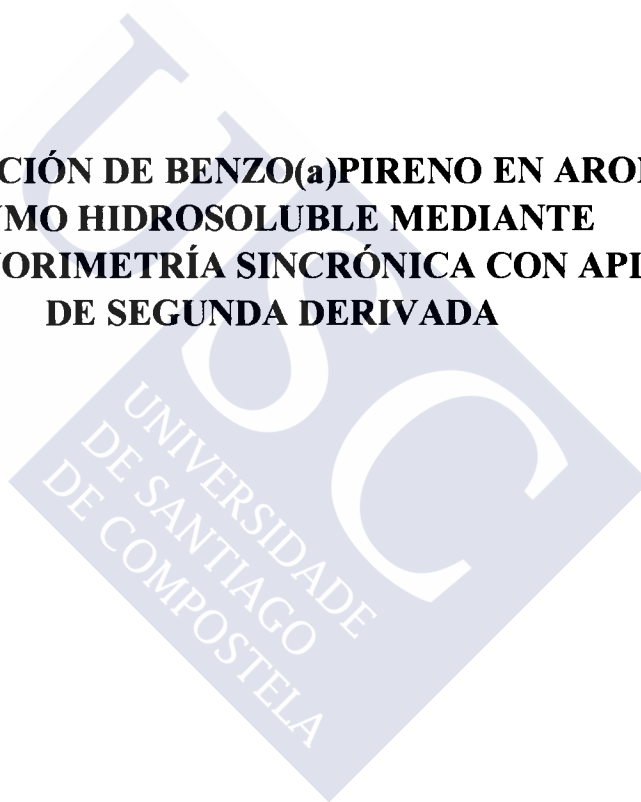
ACETONA**CLOROFORMO****DICLOROMETANO**

Figura 48.- Variación de la fluorescencia del benzo(a)pireno frente al tiempo en acetona, cloroformo y diclorometano

**DETERMINACIÓN DE BENZO(a)PIRENO EN AROMAS DE
HUMO HIDROSOLUBLE MEDIANTE
ESPECTROFLUORIMETRÍA SINCRÓNICA CON APLICACIÓN
DE SEGUNDA DERIVADA**



1. PROTOCOLO ANALÍTICO

1.1. DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras de aroma de humo analizadas fueron facilitadas por gentileza de distintas casas comerciales. Con algunas de las muestras se recibió la información adjunta que se transcribe a continuación:

-Muestra nº 1: "Emulsión marrón clara. Humo clarificado, concentrado y emulsificado en agua. Composición: agua 97 %, humo concentrado 90/10 1.5 %, cloruro sódico 1.5 % y gelatina 0.5 %. La dosis máxima es de 6.0 g/Kg, siendo la recomendada de 1.0-3.0 g/Kg de producto. Está contenida en frasco de plástico opaco".

-Muestra nº 2: "Extracto natural de humo de madera. Su empleo, oficialmente autorizado, da los mismos resultados de sabor, olor y conservación que el humo clásico. Su forma líquida permite la dosificación con precisión y la regulación de la intensidad de ahumado. Se añade en una proporción de 0.5-4 %. Está constituido por esencia vegetal aromática y extracto natural concentrado de jugo piroleñoso de maderas duras exceptuando las resinosas. Obtenido por destilaciones fraccionadas según las leyes físicas normales. Lavado en columnas de extracción mediante vacío sin adición de productos químicos. Su densidad a 20 °C es 1180 g/L. Está envasado en frasco de plástico opaco".

-Muestras nº 3, 5, 6 y 7: "Humos naturales para uso alimentario, obtenidos por combustión de virutas frescas de nogal, condensados al estado líquido y altamente purificados, de forma que su contenido en benzopirenos se estima inferior a 2 µg/Kg. Se ha controlado asimismo la presencia de carbonilos y fenoles. Pueden sustituir perfectamente al ahumado tradicional en todos los tipos de elaborados, proporcionando el color, aroma y sabor típicos de "ahumado" y simplificando los procesos de elaboración, reduciendo los tiempos y el coste. Están envasados en frascos de plástico opaco" (Tabla XXVI).

-Muestra nº 3: Aconsejado para aplicarlo en forma de ducha o en baño de inmersión, bien puro o diluido en agua hasta una relación máxima 1:5 (lo más recomendable es 1:1). Lógicamente la intensidad de sabor a humo que tomará el elaborado dependerá del tiempo de inmersión o ducha (desde unos segundos a unos minutos) y de la concentración de la solución de humo. La dosis será de 2-2.5 g/Kg de embutido.

Tabla XXVI: Características de las muestras nº 3, 5, 6 y 7.

Características	Muestra nº 3	Muestra nº 5	Muestra nº 6	Muestra nº 7
Acidez	9.5-10.5	9.5-10.5	5.5-6.5	9.5-10.5
Índice de tinción	62-72	62-72	60-70	80-100
Carbonilos (g/100 mL)	10-20	10-20	10-20	18-28
Fenoles (g/100 mL)	10-20	10-20	8-18	20-30
Densidad (g/L)	1078-1085	1078-1085	1088-1098	1100-1120
Benzopirenos (ppm)	0.001	0.001	0.001	0.001
pH	2-3	2-3	4.4-4.7	2-3
Color	Ámbar	Ámbar	Ámbar	Ámbar oscuro

-Muestra nº 5: Humo líquido concentrado en aroma y sabor y con gran poder de tinción. Es aconsejado utilizarlo por atomización, mediante boquillas atomizadoras adecuadas, bien instaladas en los hornos de cocción o en cabinas de ahumado previas a los hornos. La cantidad a añadir será aproximadamente de 2-2.5 g/Kg de embutido, dependiendo del color y sabor que se desee conseguir.

-Muestra nº 6: Tiene un pH relativamente alto que lo hace adecuado para incorporar dentro de la masa. Es aconsejable utilizarlo principalmente en el interior de las masas, directamente en las pastas finas, o incorporado en la salmuera en los productos de inyección. En este caso no puede esperarse una coloración externa y sólo proporciona el sabor y aroma típico del humo. La dosis estará entre 0.5 y 5 g/Kg de elaborado, teniendo en cuenta que si se ha ahumado exteriormente se debe rebajar la dosis.

-Muestra nº 7: es similar a la muestra nº 3, pero más concentrado en aroma, sabor y color.

-Muestras nº 4, 8 y 9: Contenidas en frascos de vidrio color topacio (sin descripción).

-Muestra nº 10 : Concentrado sólido de humo sobre sal; la dosis recomendada por el fabricante en productos cárnicos es de 2 g/Kg. Contenido en frasco de plástico opaco.

- Muestra nº 11: Aroma de humo sólido contenido en frasco de vidrio (sin descripción).

-Muestras nº 12: Se adicionan al alimento en dosis de 1-2 g/Kg. Está envasado en frasco de vidrio color topacio.

1.2. PROCEDIMIENTO (GARCÍA FALCÓN y col., 1996 c)

1.2.1. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN

La muestra de humo líquido (2 g) fue diluida con 15 mL de una mezcla de acetonitrilo:agua MILLI-Q (1:2) y pasada a través de una minicolumna Sep Pak C-18 Plus previamente activada con 5 mL de acetonitrilo seguidos de 10 mL de agua MILLI-Q.

Para completar el paso de extracción-purificación, un volumen adicional de 15 mL de la misma mezcla anterior de acetonitrilo:agua, utilizado para lavar las paredes del recipiente que contenía la muestra, es transferido a través de la minicolumna. La Sep Pak C-18, se seca bajo corriente de nitrógeno, y el B(a)P retenido es eluido a continuación con 5 mL de n-hexano, y analizado espectrofluorimetricamente.

En caso de que el extracto hexánico obtenido esté muy coloreado, se necesitará una purificación adicional con sílica previa al análisis; para ello, al igual que en la purificación de los aromas lipofílicos, el cartucho C-18, antes de la elución, se une en serie con una Sep Pak Sílica Plus, pasando a continuación los 5 mL de n-hexano. El analito queda entonces retenido en la minicolumna de sílica. Se desecha el cartucho C-18 y se pasan finalmente 10 mL de n-hexano a través de la sílica para completar la elución, recogiendo un volumen final de 15 mL; se evapora a sequedad bajo corriente de nitrógeno, y se redisuelve en 5 mL de n-hexano para ser analizado.

1.2.2. ANÁLISIS Y CONFIRMACIÓN DE RESULTADOS

El eluato hexánico es transferido a la cubeta y leído espectrofluorimétricamente antes y después de ser borboteado con nitrógeno durante 2 minutos a un flujo de 0.83 mL/seg., con las siguientes condiciones:

- Rango espectral ($\lambda_{exc.}$): 200-500 nm
- Rendija de excitación: 5 nm
- Rendija de emisión: 5 nm
- Velocidad de barrido: 240 nm/minuto
- Intervalo de longitud de onda inicial: 20 nm
- Incremento: 90 nm
- Número de registros: 2

Con estas condiciones espectrofluorimétricas se obtienen dos espectros sincrónicos, con intervalos de longitud de onda ($\Delta\lambda$) 20 y 110 nm. Para la cuantificación del B(a)P se utilizó la 2ª derivada (realizada mediante la aplicación del software FLUORESCENCE DATA MANAGER, utilizando el factor 2/9) del espectro sincrónico con $\Delta\lambda = 20$ nm previamente desoxigenado; confirmando la identidad del analito en el segundo registro ($\Delta\lambda = 110$ nm) siempre que sea posible.

Las soluciones de B(a)P en n-hexano, después de leídas, fueron evaporadas a sequedad y redisoluidas en DMSO, realizándose el espectro sincrónico correspondiente al $\Delta\lambda = 20$ nm antes y después de ser borboteado con nitrógeno, en las condiciones espectrofluorimétricas anteriormente citadas. Estos dos espectros obtenidos, también fueron utilizados para confirmar la presencia del B(a)P.

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1. PURIFICACIÓN

La espectrofluorimetría sincrónica ha sido una técnica ampliamente utilizada para la determinación de PAH en muy diversas matrices dada su sencillez, rapidez de análisis, sensibilidad y selectividad. Pero con frecuencia, la naturaleza de la matriz obliga a la realización de una etapa previa de extracción-purificación de la muestra.

En el caso del humo líquido hidrofílico utilizado como aditivo en la alimentación, la opacidad inherente de la muestra hace inviable su análisis directo por esta técnica. Los espectros que se obtienen por simple dilución del humo en agua u otro solvente polar corresponden a una señal saturada en la que el pico del analito queda encubierto. Para eliminar estas interferencias, se ha puesto a punto un método basado en el empleo de las minicolumnas Sep Pak C-18 Plus. Siguiendo el procedimiento descrito, estas minicolumnas permiten eliminar, en la mayor parte de las muestras, los componentes responsables de la opacidad y obtener un eluato transparente en la zona en la que el B(a)P exhibe su fluorescencia, apto ya para la cuantificación del analito por esta técnica.

La proporción de la mezcla acetonitrilo:agua ha sido optimizada para, en base a su polaridad, eliminar en un solo paso los compuestos interferentes y retener al mismo tiempo completamente el B(a)P en la minicolumna (Figura 49).

La elección del n-hexano como eluyente ha respondido, por un lado a su apolaridad, que permite arrastrar en su totalidad el B(a)P retenido, y por otro, a sus adecuadas características espectrofluorimétricas para la determinación de PAH en general, y del B(a)P en particular.

En caso de que el extracto hexánico obtenido esté muy coloreado, se hace necesario su paso a través de Sep Pak de sílica como purificación adicional, previa al análisis (Sección 2.2.1., páginas 66-67).

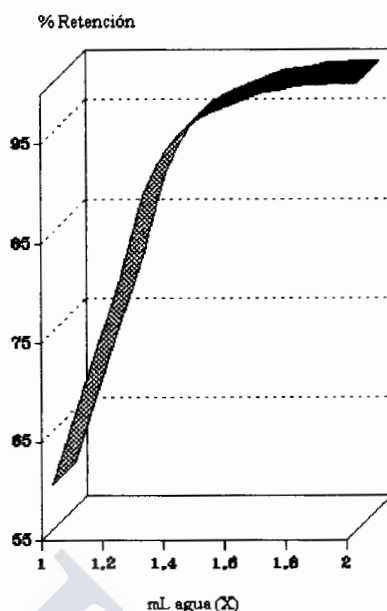


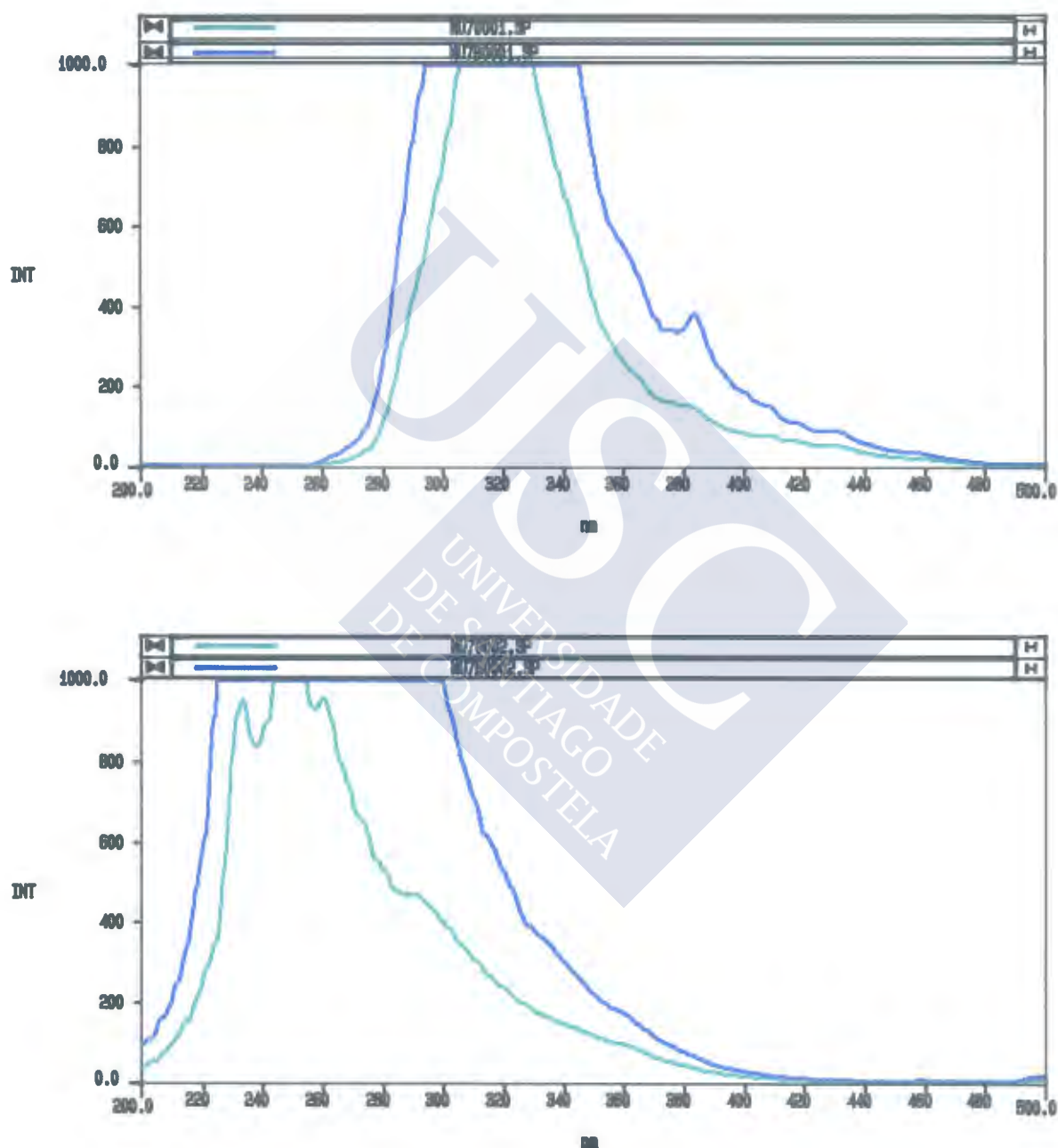
Figura 49.- Optimización de la proporción de ACN:agua (X) para la retención del benzo(a)pireno en la minicolumna Sep-pak C-18

2.2. ANÁLISIS Y CONFIRMACIÓN DE RESULTADOS

Las condiciones espectrofluorimétricas han sido optimizadas con el objeto de aumentar en lo posible tanto la resolución como la sensibilidad. Los intervalos de longitud de onda óptimos para el análisis del B(a)P en n-hexano, son los correspondientes a 20 y 110 nm, tal y como se explicó en la sección 2.1 (pag. 108-123).

Para la cuantificación del analito, se prefirió usar el espectro sincrónico con $\Delta\lambda$ 20 nm porque, aunque tiene una menor sensibilidad que el de 110 nm (ver sección 2.1, pag 108-123), este espectro presenta menos interferencias en las muestras en el rango de excitación máxima del B(a)P (384 nm); eligiéndose el último ($\Delta\lambda$ 110 nm) para la confirmación, cuando es posible (Figura 50).

En muchos casos, en los espectros directos no se consiguió una separación efectiva del analito objeto de estudio; sin embargo, mediante la aplicación de la segunda derivada, técnica utilizada con frecuencia en el análisis de multicomponentes orgánicos, se logra una intensificación de las bandas agudas, una apreciable disminución o desaparición de las anchas y la eliminación de la absorción de fondo, lo que se traduce en un aumento de selectividad, que posibilita la resolución del B(a)P, haciéndose de este modo posible su cuantificación individual (SALGADO y col., 1986) (Figuras 51 y 52).



A: Espectros de fluorescencia sincrónica de la muestra nº 7 en n-hexano antes (verde) y después (azul) del borboteo con nitrógeno ($\Delta\lambda = 20$ nm)

B: Espectros de fluorescencia sincrónica de la muestra nº 7 en n-hexano antes (verde) y después (azul) del borboteo con nitrógeno ($\Delta\lambda = 110$ nm)

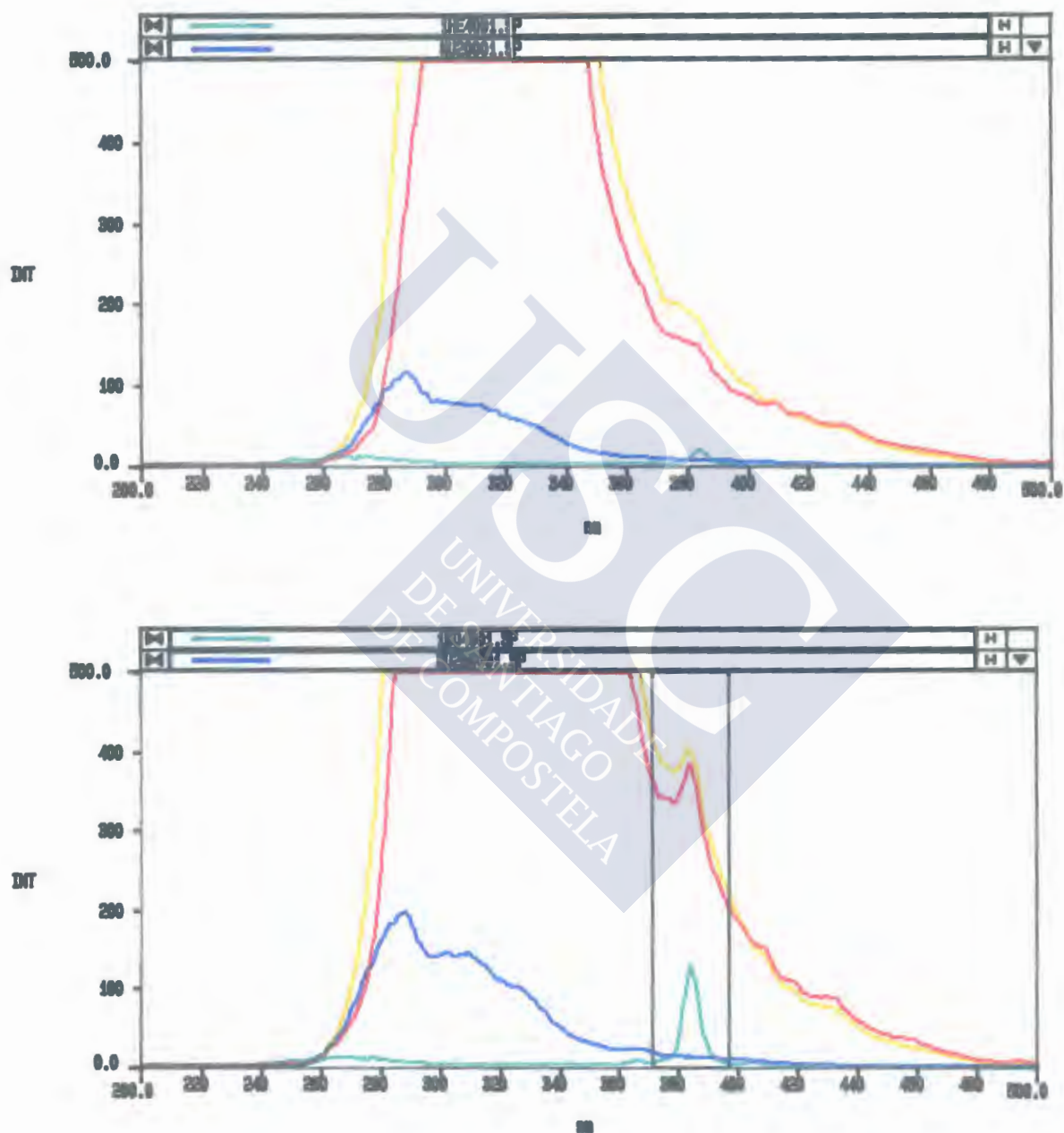


Figura 51.- Espectros de fluorescencia sincrónica de 4 $\mu\text{g/L}$ de benzo(a)pireno (verde), de la muestra n° 2 (azul), de la muestra n° 3 (amarillo) y de la muestra n° 7 (rojo) en n-hexano, antes (A) y después (B) del borboteo con nitrógeno ($\Delta\lambda = 20 \text{ nm}$)

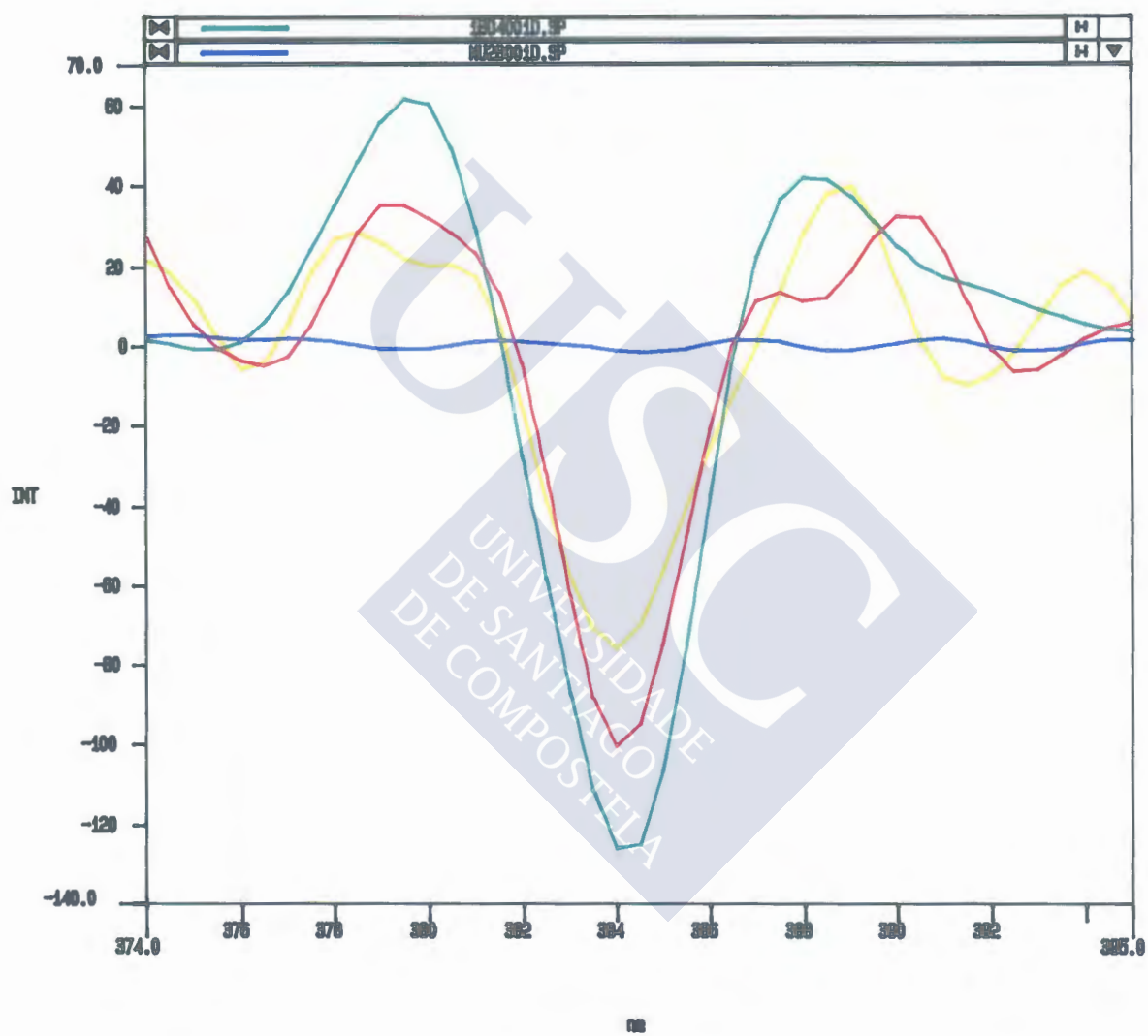


Figura 52.- Derivada de segundo orden de la zona marcada en la figura 51 (B)

Por otro lado, debido a que el oxígeno disuelto en soluciones líquidas ejerce un efecto "quenching" sobre las moléculas orgánicas inhibiendo su fluorescencia, tal y como se explicó anteriormente, se decidió realizar la lectura tras la eliminación del oxígeno mediante borboteo de las soluciones con nitrógeno, mejorándose de esta forma los límites de detección y cuantificación.

Las soluciones de B(a)P también fueron leídas en DMSO. Mientras que la fluorescencia del B(a)P en n-hexano se incrementa aproximadamente ocho veces al borbotear con nitrógeno, en DMSO lo hace solamente en 1.1 veces. Además, en este solvente el máximo de excitación se sitúa a 389 nm, 5 nm desplazado respecto al del n-hexano. Ambos hechos han sido utilizados como método de confirmación. (Figura 53)

2.3. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Los límites de detección y de cuantificación del B(a)P calculados (siguiendo las normas de la ACS) en la segunda derivada tras la eliminación del oxígeno con nitrógeno, y expresados en $\mu\text{g/L}$ de n-hexano, son 0.075 y 0.160, equivalentes a 0.19 y 0.40 $\mu\text{g/Kg}$ de aroma de humo respectivamente (considerando que partimos de 2 g de aroma y obtenemos un volumen final de n-hexano de 5 mL).

2.4. CUANTIFICACIÓN Y LINEARIDAD DE LA RESPUESTA DEL DETECTOR

La concentración del B(a)P en las muestras se determina en el sincron con $\Delta\lambda = 20$ nm, a partir de la recta de calibrado obtenida por análisis de regresión de las concentraciones 0,5, 1, 2, 4 y 8 μg de benzo(a)pireno por Litro de n-hexano, medidas por triplicado, frente a las distancias entre máximo (380 nm) y mínimo (384 nm) en el espectro de 2ª derivada, tras haber sido eliminado el oxígeno disuelto mediante borboteo (ACS, 1980).

TABLA XXVII.- Recta de calibrado del benzo(a)pireno en n-hexano obtenidas por espectrofluorimetría sincrónica ($\Delta\lambda$ 20 nm) con aplicación de segunda derivada, tras el borboteo con nitrógeno

Rango ($\mu\text{g/L}$)	$\Delta\lambda$ (nm)	$\lambda_{\text{max. min}}$ (nm)	Recta de calibrado	r
0.5-8	20	380-384	UF = 48.6[]-0.750	0.9998

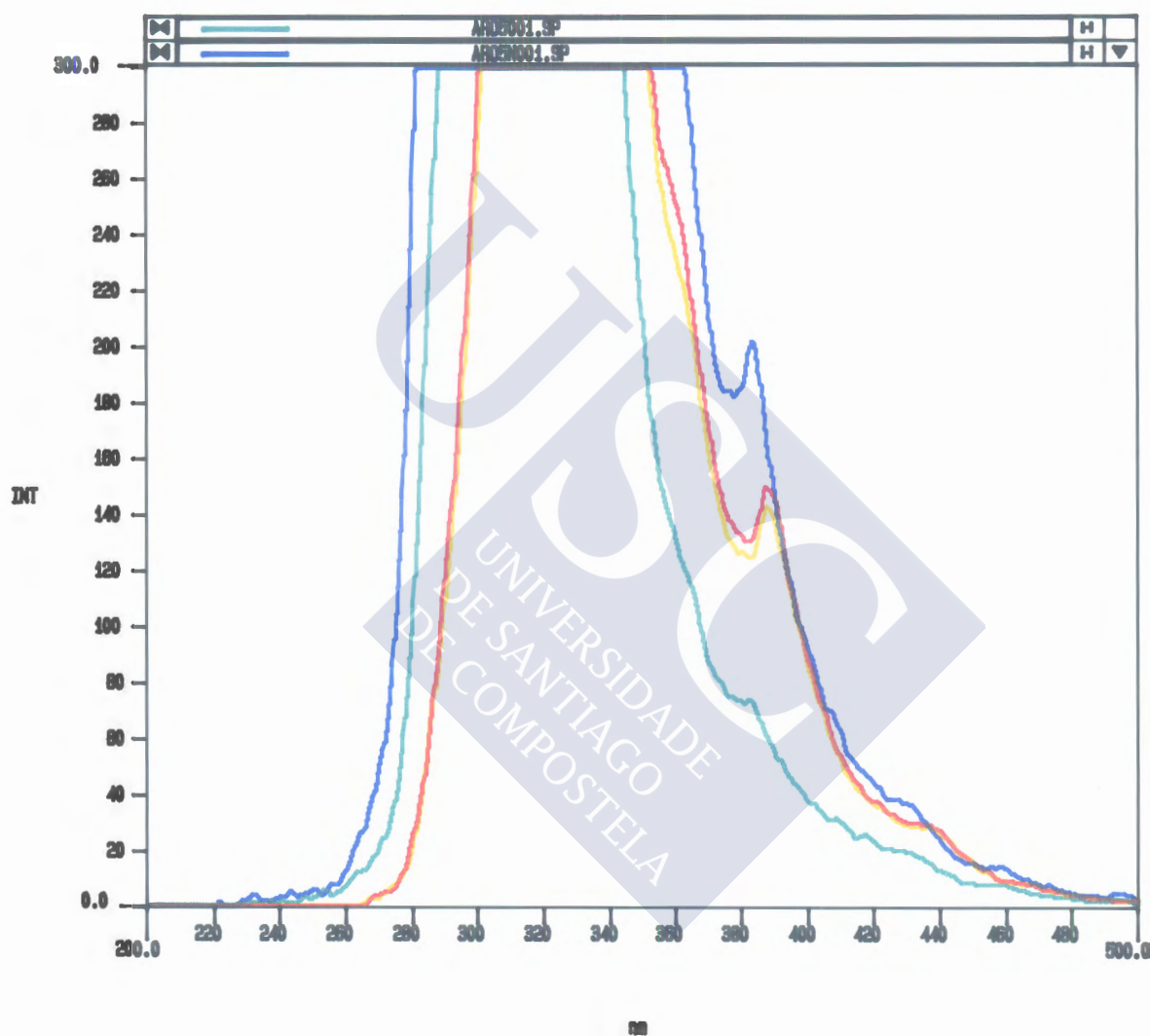


Figura 53.- Espectros de fluorescencia sincrónica de la muestra nº 5 en n-hexano antes (verde) y después (azul) del borboteo con nitrógeno y en DMSO antes (amarillo) y después (rojo) del borboteo con nitrógeno ($\Delta\lambda = 20$ nm)

La concentración de B(a)P en el aroma de humo expresada en $\mu\text{g/Kg}$, se obtuvo multiplicando su concentración en $\mu\text{g/L}$ de n-hexano por el volumen final de solución obtenida (5 mL), y dividiéndola entre los gramos de muestra exactamente pesados.

2.5. PRECISIÓN Y RECUPERACIÓN

La precisión (RSD) y recuperación (%R) del método se ha calculado sometiendo al procedimiento experimental descrito seis muestras de un AHHL (muestra nº 8) (2 g), previamente chequeado para comprobar que el B(a)P se encuentra por debajo de los límites de detección del método, sobrecargadas con este hidrocarburo a dos niveles (1.5 y 3 $\mu\text{g/Kg}$). La tabla XXVIII recoge los resultados obtenidos.

TABLA XXVIII.- RSD y % R obtenidas al someter seis veces al procedimiento experimental descrito una muestra de aroma de humo hidrofílico (nº 8) sobrecargada con benzo(a)pireno

B(a)P añadido ($\mu\text{g/Kg}$)	\bar{X} encontrada ($\mu\text{g/Kg}$)	Precisión (RSD)	Recuperación (%R)
1.5	1.4	5.2	91
3.0	2.8	5.9	93

2.6. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

Se han analizado 12 muestras de aromas de humo hidrosoluble, 10 líquidas (AHHL) y 2 sólidas (AHHS). El contenido en B(a)P para cada una de ellas se recoge en la Tabla XXIX.

Los niveles del analito en las distintas muestras oscilan entre cantidades ND y 6.54 $\mu\text{g/Kg}$, no sobrepasando ninguna de ellas el límite de 10 $\mu\text{g/Kg}$ establecido por la legislación, aunque en las nº 3 y 7 los valores encontrados son más altos que los apuntados en los datos de las muestras (Figuras 51 y 52).

TABLA XXIX.- Contenido de benzo(a)pireno ($\mu\text{g/Kg}$) en las muestras de aroma de humo hidrofílico analizadas

Muestra	Extracción mediante minicolumna C-18 Plus ($\mu\text{g/Kg}$)
AHHL1	1.87
AHHL2	ND
AHHL3	4.60
AHHL4	0.41
AHHL5	1.48
AHHL6	0.77
AHHL7	6.59
AHHL8	ND
AHHL9	1.05
AHHS10	0.54
AHHS11	ND
AHHL12	0.51

CONCLUSIONES



SOBRE EL MÉTODO:

1.- Se propone, para la determinación de benzo(a)pireno en alimentos ahumados, un método cromatográfico con detección de fluorescencia, basado fundamentalmente en la extracción de la grasa por ultrasonidos, purificación mediante Sep Pak de sílica, partición con dimetilsulfóxido, concentración a través de minicolumna C-18 y confirmación de los resultados por medio de espectros sincrónicos y de emisión realizados por HPLC-FL sin parar el flujo. La precisión del método ($RSD \% < 9$), la recuperación ($\% R > 74$) y los límites de detección ($< 0.0098 \mu\text{g/Kg}$) y cuantificación ($< 0.018 \mu\text{g/Kg}$) resultaron satisfactorios.

2.- Para la determinación de benzo(a)pireno en aromas de humo liposolubles, se propone una adaptación del método anterior que consiste en la disolución de la muestra en n-hexano, partición con dimetilsulfóxido, purificación a través de Sep Pak C-18 y sílica, determinación por cromatografía con detector de fluorescencia y confirmación mediante espectros sincrónicos y de emisión realizados por HPLC-FL sin parar el flujo. En el estudio de la precisión ($RSD \%$) y de la recuperación ($\% R$) se obtuvieron valores de 87 e inferiores a 3.2, respectivamente. Los límites de detección ($0.024 \mu\text{g/Kg}$) y de cuantificación ($0.045 \mu\text{g/Kg}$) fueron satisfactorios.

3.- Se confirma la variación de la sensibilidad espectrofluorimétrica del benzo(a)pireno en función del solvente utilizado (correspondiendo al dimetilsulfóxido los límites de detección y cuantificación más bajos), así como la satisfactoria estabilidad del analito a la luz, en n-hexano, tolueno, benceno y acetonitrilo. Se sugiere aumentar la sensibilidad espectrofluorimétrica del benzo(a)pireno eliminando el oxígeno disuelto en las soluciones, mediante borboteo con nitrógeno.

4.- Se propone el n-hexano como solvente para la determinación de benzo(a)pireno mediante espectrofluorimetría en base a su transparencia, a la estabilidad que presenta el analito y al considerable incremento de la sensibilidad al eliminar el efecto "quenching" provocado por el oxígeno.

5.- Para la determinación de benzo(a)pireno en aromas de humo hidrosoluble se propone un método basado en la espectrofluorimetría sincrónica con aplicación de segunda derivada. La muestra se disuelve en ACN:agua (1:2), se purifica a través de minicolumnas C-18, eluyéndose el benzo(a)pireno con n-hexano. La confirmación se realizó por redisolución de la muestra en dimetilsulfóxido. Los límites de detección y de cuantificación obtenidos tras borboteo con nitrógeno son 0.19 y $0.40 \mu\text{g/Kg}$,

respectivamente, la precisión (RSD %) es inferior a 5.9, y la recuperación (% R) superior a 91.

SOBRE RESULTADOS:

6.- Se analizaron un total de 51 muestras de alimentos, todas ellas ahumadas y/o adicionadas de aroma de humo, poniéndose de manifiesto que:

- Las muestras de derivados cárnicos a las que se les adicionó "extracto de humo" contienen concentraciones de benzo(a)pireno que oscilan entre ND y 0.026 $\mu\text{g/Kg}$, todas ellas inferiores al límite establecido por la legislación, de 0.03 $\mu\text{g/Kg}$.

- En los productos sometidos a ahumado natural se ha detectado benzo(a)pireno en prácticamente todas las muestras, con concentraciones especialmente elevadas en aquellas con bajo contenido en humedad, correspondientes a las muestras nº 20 (0.34 $\mu\text{g/Kg}$), nº 21 (0.12 $\mu\text{g/Kg}$), nº 24 (0.91 $\mu\text{g/Kg}$), nº 38 (0.83 $\mu\text{g/Kg}$) y nº 48 (2.46 $\mu\text{g/Kg}$).

7.- En las 13 muestras de aromas de humo analizadas, se encontraron concentraciones de benzo(a)pireno que oscilan entre valores ND y 6.54 $\mu\text{g/Kg}$, no sobrepasando en ningún caso el límite de 10 $\mu\text{g/Kg}$ establecido por la legislación.

8.- Por último, y para evitar la presencia de altos contenidos de PAH en los alimentos y por lo tanto proteger la salud de los consumidores, se propone:

- La utilización del aditivo "extracto de humo" en un mayor número y tipo de productos alimenticios en sustitución del ahumado natural, lo que permitiría un mayor control de los niveles de PAH en los alimentos.

- Una limitación para el contenido de benzo(a)pireno en los productos sometidos a ahumado natural, lo que implica un mayor control en la tecnología del ahumado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



- AAMOT, E.; STEINNES, E.; SCHMID, R.** (1996) Polycyclic aromatic hydrocarbons in Norwegian forest soils: impact of long range atmospheric transport. *Environ. Pollut.*, **92** (3), 275-280.
- ABBOTT, D. W.; MOODY, R. L.; MANN, R. M.; VO-DINH, T.** (1986) Synchronous luminiscence screening for polynuclear aromatic compounds in environmental samples collected at a coal gasification process development unit. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, **47** (7), 379-385.
- ACREE, W. E.; TUCKER, S. A.; ZVAIGZNE, A. I.; STREET, K. W.; FETZER, J. C.; GRURTZMACHER, H. F.** (1990 a) Polycyclic aromatic hydrocarbons solute probes. Part VII: Evaluation of additional coronene derivatives as possible solvent polarity probe molecules. *Appl. Spectrosc.*, **44** (3), 477-482.
- ACREE, W. E.; TUCKER, S. A.; CRETILLA, L. E.; ZVAIGZNE, A. I.; STREET, K. W.; FETZER, J. C.; NAKASUJI, K.; MURATA, I.** (1990 b) Polycyclic aromatic hydrocarbons and polycyclic aromatic heterocycles: Examination of molecular structure-fluorescence probe character correlations. *Appl. Spectrosc.*, **44** (6), 951-957.
- ACS SUBCOMMITTEE ON ENVIRONMENTAL ANALYTICAL CHEMISTRY** (1980) Guidelines for data adquisition and data evaluation in environmental chemistry. *Anal. Chem.*, **52** (14), 2242-2249.
- AKPAN, V.; LODOVICI, M.; DOLARA, P.** (1994) Polycyclic aromatic hydrocarbons in fresh and smoked samples from the three Nigerian cities. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **53**, 246-253.
- AL-YABOOB, S.M.; SAEED, T; AL-HASHASH, H.** (1994) Polycyclic aromatic hydrocarbons in fish: exposure assessment for kuwaiti consumers after the gulf oil spill of 1991. *Environ. Int.*, **20** (2), 221-227.
- ALONGUE, D. O.** (1988) Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) determined in Nigerian kundi (smoke-dried meat). *J. Sci. Food Agric*, **43**, 167-172.
- ALPENDURADA, M.F.** (1993) Separação de misturas complexas de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos por cromatografia líquida de alta pressão en fase inversa. *Rev. Port. Farm.*, **XLIV** (1), 41-47.

ANDRE, J. C.; BOUCHY, M.; BAUDOT, PH.; NICLAUSE, M. (1977a) Quantitative studies of the synchronous excitation method in spectrofluorimetry: application to tracer concentration measurements in hidrology. *Anal. Chim. Acta*, **92**, 369-378.

ANDRE, J. C.; BAUDOT, PH.; NICLAUSE, M. (1977b) Application of synchronous excitation espectrofluorimetry to drug analysis. *Clin. Chim. Acta*, **76**, 55-66.

ANDRE, J. C.; BOUCHY, M.; VIRIOT, M. L. (1979) Synchronous excitation method for increasing sensitivity in fluorimetry. The limitations caused by Raman and Rayleigh Scatter. *Anal. Chim. Acta* **105**, 297-310.

ANDRE, J. C.; BOUCHY, A.; JEZEQUEL, J. Y. (1986) Increased apparent sensitivity by means of constant-energy synchronous spectrofluorimetry. *Anal. Chim. Acta*, **185**, 91-99.

APHA (American Public Health Association), **AWWA** (American Water Works Association), **WPCF** (Water Pollution Control Federation) (1989). *Standard methods for examination of water and wastewater* 17 th. Ed. APHA. Publication Office: American Public Health Association, Washington.

APHA (American Public Health Association), **AWWA** (American Water Works Association), **WPCF** (Water Pollution Control Federation) (1992). *Standard methods for examination of water and wastewater* 18 th. Ed. APHA. Publication Office: American Public Health Association, Washington.

ASTM (American Society for Testing Materials) (1989) *Annual Book of ASTM Standard*. A. ASTM 11 th. Ed.

BAILEY E. J.; DUNGAL N. (1958) Polycyclic hydrocarbons in icelandic smoked food. *Brit. J. Cancer*, **12**, 348-350.

BARNABAS, I. J.; DEAN, J. R.; TOMILSON, W. R.; OWEN, S. P. (1995). Experimental design approach for the extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil using supercritical carbon dioxide. *Anal. Chem.*, **67**, 2064-2069.

BAUDOT, PH; VIRIOT, M. L.; ANDRE, J. C.; JEZEQUEL, J. Y.; LAFONTAINE, M. (1991) Analysis of polyaromatic hidrocarbons by synchronous fluorescence spectrometry: applications to occupational health. *Analisis*, **19**, 85-97.

BIRKHOLZ, D. A. (1988) Determination of polycyclic aromatic hidrocarbons compounds in fish tissue. *J. Chromatogr.*, **449**, 251-260.

BORGERT, C.R.; ROBERTS, S.M.; JAMES, R.C.; HARBISON, R.D. (1993) *Health Risk Assessment: Dermal and Inhalation Exposure and Absorption of Toxicants*, Wang, R.G.M.; Knaak, J.B.; Maibach, H.I. (Eds), CRC Press, Boca Raton, Florida, 455-470.

BRAVO, A. H.; SALAZAR S. L. (1978) Polyaromatic hidrocarbons in oysters from coastal lagoons along the eastern coast of the gulf of Mexico, Mexico. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 171-6.

CABANNISS, S. E.; SHUMAN, M. S. (1987) Synchronous fluorescence spectra of natural waters: tracing sources of dissolved organic matter. *Mar. Chem.* **21**, 37-50.

COATES, J.T.; ELZERMAN, A. W. (1986) Extraction and determination of selected polycyclic aromatic hidrocarbons in plant tissues. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **69** (1), 110-114.

COCCHIERI, R. A.; ARNESE, A; MINICUCCI A. M. (1990) Polycyclic aromatic hidrocarbons in marine organisms from Italian central Mediterranean coasts. *Mar. Pollut. Bull.*, **21** (1), 15-18.

DANKERS, J.; GROENENBOOM, M.; SCHOLTIS L. H. A.; VAN DER HEIDEN, C. (1993) High-speed supercritical fluid extraction method for routine measurement of polycyclic aromatic hidrocarbons in environmental soils with dichloromethane as a static modifier. *J. Chromatogr.* **641**, 357-362.

DE VOS, R. H.; VAN DORKUM, W.; SCHOUTEN, A.; JONG-BERKHOUT, P. (1990) Polycyclic aromatic hidrocarbons in Dutch total diet samples (1984-1986) *J. Chem. Toxicol.* **28** (4), 263-268.

DENNIS, M.J.; MASSEY, R. C.; McWEENY, D. J.; KNOWLES, M. E. (1983) Analysis of polycyclic aromatic hidrocarbons in UK total diets. *Food Chem. Toxicol.* **21**, 569-574.

DENNIS, M. J.; MASSEY, R. C.; McWENNY, D. J.; LARSSON, B.; ERIKSSON, A.; SAHLBERG, G. (1984) Comparison of a capillary gas chromatographic and a high-performance liquid chromatographic method of analysis for polycyclic aromatic hidrocarbons in food. *J. Chromatogr.*, **285**, 127-133.

DENNIS, M. J.; MASSEY, R. C.; CRIPPS, G.; VENN, I.; HOWARTH, N.; LEE, G. (1991) Factors affecting the polycyclic aromatic hidrocarbon content of cereals, fats and other food products. *Food Addit. Contam.* **8** (4), 517-530.

DERACHE, R. (1990) *Toxicología y seguridad de los alimentos*. Ed. Omega, S.A. Barcelona, 296-318.

DIRECTIVA 80/778/CEE de 15 de julio de 1980 relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano. (DOCE N° L 229/11, de 30 de agosto) (1980).

DIRECTIVA 88/388/CEE de 22 de junio de 1988 relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en el ámbito de los aromas que se utilizan en los productos alimenticios y de los materiales de base para su producción. (DOCE L 184, 61-66) (1988).

DIRECTIVA 91/443/CEE de 22 de julio de 1991 por la que se fijan las normas sanitarias aplicables a la producción y a la puesta en el mercado de los productos pesqueros (DOCE, L268, 15-34, 1991) (1991).

EZZEL, J. L. (1995) The use of ODS embedded glass fiber matrix disks as traps for supercritical fluid extraction. *Methods Instrument.* **2** (1), 48-51.

FABRE R.; TRUHAUT R. (1976). *Tratado de Toxicología*. Tomo 1. Ed. Paraninfo, S.A. Madrid, 197-202.

FAO/OMS. (1987) 31° Informe del Comité de Expertos en Aditivos alimentarios. 759. Evaluación de ciertos aditivos alimentarios y contaminantes de los alimentos. OMS. Ginebra.

FAO/OMS. (1991) 37º Informe del Comité de Expertos en Aditivos alimentarios. 759. Evaluación de ciertos aditivos alimentarios y contaminantes de los alimentos. OMS. Ginebra.

FAZIO, T.; WHITE, R. H.; HOWARD, J. W. (1973) Collaborative study of the multicomponents methods for polycyclic aromatic hydrocarbons in foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **56**, 68-75.

FILES, L. A.; JONES, B. T.; HANAMURA, S.; WINEFORDNER, J. D. (1986) Gasoline engine exhaust analysis using constant energy synchronous luminescence spectrometry. *Anal Chem.*, **58**, 1440-1443.

FOOD RESEARCH INSTITUTE (1995) *Food Safety 1995*. Ed. Marcel Dekker, Inc., New York, USA. pp 276-279.

FRETHEIM, K. (1976) Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in Norwegian smoked meat sausages. *J. Agric. Food Chem.*, **24** (5), 976-979.

FURTON, K. G.; JOLLY, E. (1993) Variables affecting the supercritical fluid extraction of analytes from octadesylsilane solid-phase sorbents. *J. Chromatogr.*, **629**, 3-9.

GADZALA, R. M.; BUSZEWSKI, B. (1995) Properties and determination of Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) using chromatographic methods. *Polish J. Environ. Studies*, **4** (1), 5-15.

GARCÍA FALCÓN, M. S.; LÓPEZ DE ALDA VILLAIZÁN, M. J.; GONZÁLEZ AMIGO, S.; SIMAL LOZANO, J.; LAGE YUSTY, M. A. (1996 a) Enrichment of benzo(a)pyrene in smoked food products and determination by HPLC-FL. *J. Chromatogr.* (Aceptada para publicación el 10 de junio de 1996)

GARCÍA FALCÓN, M. S.; LÓPEZ DE ALDA VILLAIZÁN, M. J.; GONZÁLEZ AMIGO, S.; SIMAL LOZANO, J.; LAGE YUSTY, M. A. (1996 b) Determination of benzo(a)pyrene in Lipid-soluble liquid smoke by HPLC-FL. *Food Addit. Contam.*, **13** (7), 863-870.

GARCÍA FALCÓN, M. S.; LÓPEZ DE ALDA VILLAIZÁN, M. J.; GONZÁLEZ AMIGO, S.; SIMAL LOZANO, J.; LAGE YUSTY, M. A. (1996 c) Determination of Benzo(a)pyrene in Water-soluble liquid smoke by second derivative constant wavelenght synchronous spectrofluorimetry. *Talanta*, **41**, 659-664.

GARCÍA VIOR, L. O.; POSSIDONI DE ALBINATI, J. F. (1987) Valoración de trazas de benzo(a)pireno como contaminante ambiental por espectrofluorimetría de luminiscencia sincrónica. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, **21** (2), 239-248.

GERE, D. R. (1994) Environmental supercritical fluid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in solid waste. *Hewlett Packard Application*, Note 228-284.

GERTZ, H.; KOGELEHEIDE, H. (1994) Investigation and legal evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable fats and oils. *Fat Sci. Technol.* **96** (5)175-180.

GILBERT, J.; KNOWLES, M.E. (1975) The chemistry of smoked foods: a review. *J. Food Technol.*, **10**, 245-261.

GIRARD, J. P. (1991) *Tecnología de la carne y de los productos cárnicos*, Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, 183-223.

GOMAA, E. A.; GRAY, J. I.; RABIE, S.; LÓPEZ-BOTE, C.; BOOREN, A.D. (1993) Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked foods products and commercial liquid smoke flavourings. *Food Addit. Contam.*, **10** (5), 503-521.

GORBATOV V. M.; KRYLOVA N. N.; VOLOVINSKAYA V. P.; LYASKOVSKAYA YU. N.; BAZAROVA K. I.; KHLAMOVA R. I.; YAKOVLEVA G. YA. (1971), Liquid smokes for use in cured meats, *Food Technol.*, **25**, 71-77.

GRIEST, W. H.; CATON, J. E. (1983) Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons for quantitative analysis. Handbook of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, edited by A. Bjorseth (New york:Marcel Dekker), 95-147.

GRIMMER, G.; BOHNKE, H. (1975) Polycyclic aromatic compounds profile analysis of high-protein foods, oils and fats by gas chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **58**, 725-733.

- GUILLEN, M.D.** (1994) Polycyclic aromatic compounds: extraction and determination in food. *Food. Addit. Contam.*, **11** (6), 669-684.
- GUILLÉN, M. D.; MANZANOS, M. J.; IBAIGORTIA, M. L.** (1996) Ahumado de alimentos. preparación, aplicación, métodos de estudio y composición de aromas de humo. *Alimentaria*, **Julio-Agosto**, 45-53.
- GUNTHER, F. A.; BUZZETTI, F.** (1965) Occurrence, isolation and identification of polynuclear hydrocarbons as residues. *Res. Rev.*, 90-113
- GUTIERREZ, C.; RUBIO, S.; GÓMEZ-HENS, A.; VALCARCEL, M.** (1987) Simultaneous determination of histamine and spermidine by second-derivative synchronous fluorescence spectrometry. *Anal. Chim Acta.*, **193**, 349-354.
- HAENNI, E. O.** (1968) Analytical control of polycyclic aromatic hydrocarbons in food and food additives. *Res. Rev.*, **24**, 42-78.
- HANSEN, A. M.; OLSEN, I. L. B.; POULSEN, O. M.** (1992) Polycyclic aromatic hydrocarbons in air samples of meat smokehouses. *Sci. Total Environ.*, **126**, 17-26.
- HECHLER, U.; STORKRBAUM, G.; STUMPF, G.** (1992) Bestimmung von polycyclischen aromatischen kohlenwasserstoffen (PAK) in pflanzlichen Lebensmitteln. *Lebensmittelchemie*, **46**, 25.
- HECHLER, U.; FISCHER, J.; PLAGEMANN, S.** (1995), Comparison of different extraction methods for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil, *Fresen. J. Anal. Chem.*, **351**, 591-592.
- HILLS; J. W., HILL; H. H.** (1993) Carbon dioxide supercritical fluid extraction with a reactive solvent modifier for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Chromatogr. Sci.*, **31**, 6-12.
- HOLOUBEK, I.; HOUSKOVA, L.; SEDA, Z.; HOLOUBKOVA, I.; KOTT, F.; KORINEK, P.; BOHACEK, Z.; CASLAVSKY, J.; BEZACINSKY, M.; MIKES, C.; HORAK, M.; KOCAN, A.; PETRIK, J.** (1990 a) Project TOCOEN. The fate of selected organic pollutants in the environment. I. Introduction. *Toxicol. Environ. Chem.* **29**, 9-17.

HOLOUBEK, I.; PAASIVIRTA, J.; MAATELA, P.; LAHTIPERÄ, M.; HOLOUBKOVA, I.; KORÍNEK, P.; BOHÁČEK, Z.; CÁSLAVSKY, J. (1990 b) Comparison of extraction methods for polycyclic aromatic hydrocarbon determination in sediments. *Toxicol. Environ. Chem.*, **25**, 137-154.

HOWARD, J. H.; TEAGUE, R. T.; WHITE, R. H.; FRY, B. E. (1966a) Extraction and estimation of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked foods. I. General method. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **49** (3), 595-611.

HOWARD, J. W.; WHITW, R. H.; FRY, B. E.; TURICCHI, B. W. (1966b) Extraction and estimation of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked foods. II. Benzo(a)pyrene. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **49** (3), 612-617.

HOWARD, J. W.; FAZIO, T.; WHITW, R. H. (1968) Extraction and estimation of polycyclic aromatic hydrocarbons in total diet composites. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **51** (1), 122-129.

HOWARD, J. W. ; FAZIO, T. (1980) Analytical methodology and reported findings of Polycyclic aromatic hydrocarbons in foods, *J. Assoc Off. Anal. Chem.*, **63** (5), 1077-1105.

INMAN, L. E. JR.; WINEFORDNER D. J. (1982 a) Constant-energy synchronous fluorescence for reduction of raman scatter interference. *Anal. Chim Acta*, **138**, 245-252.

INMAN, L. E. JR.; WINEFORDNER D. J. (1982 b) Constant-energy synchronous fluorescence for analysis of polynuclear aromatic hydrocarbon mixtures. *Anal. Chem.* **54**, 2018-2022.

ISCO INC., (1991), A comparison of SFE and Soxhlet methods for extraction of organic analytes, *Isco Appl. Bull.*, **71**.

IZQUIERDO, P.; GUTIERREZ, C.; GOMEZ-HENS, A.; PEREZ-BENDITO, D. (1990) Simultaneous determination of cephadrine and cephalexin in serum by derivative synchronous fluorescence spectrometry. *Anal. Chim. Acta.*, **218**, 167-171.

JOE, K. L.; SALEMME, J.; FAZIO, T. (1984) Liquid chromatographic determination of trace residues of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **67** (6), 1076-1082.

KATIYAR, S.K.; AGARWAL, R.; MUKHTAR, H. (1993) en *CRC Handbook of Chromatography: Liquid chromatography of polycyclic aromatic hydrocarbons*, H.S. Rathore y J. Sherma (Eds), CRC Press, Boca Raton, Florida, 1-7.

KOLAROVIC, L.; TRAITLER, H. (1982) Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils by caffeine complexation and glass capillary gas chromatography. *J. Chromatogr.*, **237**, 263-272.

KRANH, M. M.; MOORE, L. K.; BOGAR, R. G.; WIGREN, C. A.; CHAN, S.; BROWN, D. W. (1988) High performance liquid chromatographic method for isolating organic contaminants from tissue and sediments extracts. *J. Chromatogr.*, **437**, 161-175.

LAFFON LAGE, B. Aplicación de los fluidos supercríticos a la extracción de benzo(a)pireno (1996) Tesis Doctoral dirigida por Simal Lozano, J. y Lage Yusty, M.A. Dpto. de Química Analítica Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela.

LARSSON, B. K.; SAHLBERG, G. (1981) Polycyclic aromatic hidrocarbons in lettuce. Influence of a highway and an aluminium smelter. *Polynuclear Aromatic Hydrocarbons: Sixth Internacional Symposium on Physical and Biological Chemistry* (Columbus, Ohio), 417-426.

LARSSON, B. K. (1985) Polycyclic aromatic hidrocarbons and lead in roadside lettuce and rye grain. *J. Sci. Food Agric.*, **36**, 463-470.

LARSSON, K. B.; PYYSALO, H.; MARKETTA, S. (1988) Class separation of mutagenic polycyclic organic material in grilled and smoked foods. *Z Lebensm. Unters Forsch*, **187**, 546-551.

LARSSON, B. K.; OSTERDAHL, B. G.; REGNER, S. (1990) Polycyclic aromatic hidrocarbons and volatile N-nitrosamines in some dried agricultural products. *Swedish Journal of Agricultural Research*, **20**, 49-56.

LARSSON, B. K.; REGNER, S.; BAELING, P. (1991) Polycyclic aromatic hidrocarbons and N-nitrosamines content of wheat grain before and after direct gas-fired drying. *J. Sci. Food. Agric.*, **56**, 373-384.

LAW, R.; ANDRULEWICZ, E. (1983) Hydrocarbons in water, sediment and mussels from the southern Baltic sea. *Mar. Pollut. Bull.*, **14** (8), 289-293.

LAWRENCE, J. (1984) *Foods constituents and food residues. Their chromatographic determination*. Marcel Dekker Inc.

LEBO, J. A.; ZAJICEK, J. L.; SCHWARTZ, T. R.; SMITH, L. M.; BEASLEY, M. P. (1991) Determination of monocyclic and polycyclic aromatic hydrocarbons in fish tissue. *Pesticide and Industrial Chemical Residues*, **74** (3), 538-544.

LI, Y. Q.; HUANG, X. Z.; XU, J. G.; CHEN, G. Z. (1992) Derivative constant-energy synchronous fluorescence for simultaneous analysis of polynuclear aromatic hydrocarbon mixtures. *Anal Chim. Acta*, **256**, 285-291.

LIJINSKY, W; SHUBIK, P. (1964) Benzo(a)pyrene and other polynuclear hydrocarbons in charcoal-broiled meat. *Science*, **145**, 53-55.

LIJINSKY, W; SHUBIK, P. (1965) The detection of polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid smoke and some foods. *Toxicol. and Appl. Pharmacol.*, **7**, 337-343.

LIJINSKY, W; ROSS, A. (1967) Production of carcinogenic polynuclear hydrocarbons in the cooking of food. *Food. Cosmet. Toxicol.*, **5**, 343-347.

LIJINSKY, W. (1991) The formation and occurrence of polynuclear aromatic hydrocarbon associated with food. *Mutat. Res.*, **259**, 251-261.

LLOYD, J. B. F. (1971) Synchronized excitation of fluorescence emission spectra. *Nature, Phys. Sci.*, **64**, 231.

LLOYD, J. B. F. (1977) Raman peaks in synchronously excited emission spectra as a reference for purity of fluorescence-grade solvents. *Analyst* **102**, 782-785
aman peaks in synchronously excited emission spectra as a reference for purity of fluorescence-grade solvents. *Analyst*, **102**, 782-785.

LODOVICI, M.; DOLARA, P.; CASALINI, C.; CIAPPELLANO, S.; TESTOLIN, G. (1995) Polycyclic aromatic hydrocarbon contamination in the Italian diet. *Food Addit. Contam.*, **12**, 703-713.

LÓPEZ DE ALDA VILLAIZÁN, M. J.; ÁLVAREZ PIÑEIRO, M. E.; GARCÍA FALCÓN, M. S.; LAGE YUSTY, M. A.; SIMAL LOZANO, J. (1994 a) Hexane as solvent for determination of PAH in spectrofluorimetry. *Analisis*, **22**, 495-498.

LÓPEZ DE ALDA VILLAIZÁN, M. J., SIMAL GÁNDARA, M., SIMAL LOZANO, J., LAGE YUSTY, M. A.; GARCÍA FALCÓN, S. (1994 b) *Libro de Ponencias y Comunicaciones del V Congreso Farmaceutico de Alimentación*, Consell de Col·legis Farmacèutics de Catalunya and Vocalía Nacional de Alimentación del Consejo General de Colegios Oficiales Farmacéuticos de España (Ed.), 113. Platja d'Aro, Girona, Spain.

LÓPEZ DE ALDA VILLAIZÁN, M. J.; GARCIA FALCON, M. S.; LAGE YUSTY, M. A.; SIMAL LOZANO, J. (1995 a) Synchronous spectrofluorimetry determination of the six polycyclic aromatic hydrocarbons officially designated as indicators of drinking water quality. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, **78** (2), 402-406.

LÓPEZ DE ALDA VILLAIZÁN, M. J.; SIMAL LOZANO, J.; LAGE YUSTY, M.A. (1995 b) Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking and surface waters from Galicia (N. W. Spain) by constant-wavelength synchronous spectrofluorimetry. *Talanta*, **42**, 967-970.

LÓPEZ DE ALDA VILLAIZÁN, M. J.; GARCIA FALCON, M. S.; GONZÁLEZ AMIGO, S.; LAGE YUSTY, M. A.; SIMAL LOZANO, J. (1996) Second-derivative constant-wavelength synchronous scan spectrofluorimetry for determination of benzo[*b*]fluoranthene, benzo[*a*]pyrene and indeno[1,2,3-*cd*]pyrene in drinking water. *Talanta*, **43**, 1405-1412.

MAGA, J. A. (1986) Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) composition of mesquite (*Prosopis fuliflora*) smoke and grilled beef. *J. Agric. Food Chem.*, **34**, 249-251.

MÄKELA, M.; PYY, L. (1995) Effect of temperature on retention time reproducibility and on use of programmable fluorescence detection of fifteen polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Chromatogr. A*, **669**, 49-57.

MASUDA, Y.; KURATSUNE, M. (1971) Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish, "katsuobushi", *Gann*, **62**, 27-30.

MENICHINI, E.; BOCCA, A.; MAERLI, F.; IANNI, D. and MONFEDRINI, F. (1991 a) Polycyclic aromatic hydrocarbons in olive oils on the Italian market. *Food Addit. Contam.*, **8** (3), 363-369.

MENICHINI, E.; DOMENICO, A.; BONANNI, L.; CORRADETTI, E.; MAZZANTI, L.; ZUCCHETTI, G. (1991 b) Reliability assessment of a gas chromatographia method for polycyclic aromatic hydrocarbons in olive oil . *J. Chromatogr.*, **555**, 211-220.

MENZIE CH. A., POTOCKI B. B.; SANTODONATO J. (1992) Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environ. Sci. Technol.* **26** (7), 1278-1284.

MILLER, K. (1987) *Toxicological aspects of food*. Elsevier Applied Science. London, 205-211.

MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO (1987) *Listas positivas de aditivos alimentarios*. Tomo II. Ed. Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid.

MOREL, G.; SAMHAN, O.; LITERATHY, P.; AL-HASHASH, H.; MOULIN, L.; SAEED, T.; AL-MATROUK, K.; MARTIN-BUYER, M.; SABER, A.; PATUREL, L.; JAROSZ, J.; VIAL, M.; COMBET, E.; FACHINGER, C.; SUPTIL, J. (1991) Evaluation of chromatographic and spectroscopic methods for the analysis of petroleum-derived compounds in the environment. *Fres. J. Anal. Chem.*, **339**, 699-715.

MORSELLI, L.; ZAPPOLI, S. (1988) PAH determination in samples of environmental interest. *Sci. Total Environ.*, **73**, 257-266.

MOTHERSHEAD, R. F.; HALE, R. C. (1992) Influence of Ecdysis on the accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in field exposed blue crabs (*Callinectes Sapidus*). *Mar. Environ. Res.*, **33**, 145-156.

MULTON, J.L. (1987) *Aditivos y auxiliares de fabricación en las industrias agroalimentarias*. Ed. Acribia. Zaragoza, 494-505.

MUÑOZ DE LA PEÑA, A.; SALINAS, F.; DURÁN, M.S. (1991) Simultaneous determination of propranolol and hydralazine by derivative synchronous spectrofluorimetry. *Anal. Chim. Acta.*, **255**, 317-323.

NOLL, I. B.; TOLEDO, M. C. (1995) Hidrocarburos aromáticos policíclicos en carnes de Brasil asadas sobre carbón. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*. **35** (2), 209-216.

OGBADU, G. H.; OGBADU, L. J. (1989) Levels of benzo(a)pyrene in some smoked ready-to-eat Nigerian foods. *Lebensmittel, Wissenschaft und Technologie*, **22**, 313-314.

OPS (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD) (1985) *Guías para la calidad del agua potable, vol. 1 Recomendaciones*. Washington, D.C., 1985 (Publicación Científica N° 481).

ORDEN DE 29 DE NOVIEMBRE DE 1985 de la Presidencia de Gobierno por la que se aprueban las Normas de Calidad para Quesos y Quesos Fundidos (BOE n° 115 de 13 de mayo de 1988).

PERFETTI, G.A.; NYMAN, P.J.; FISHER, S.; JOE, F.L.Jr.; DIACHENKO, G.W. (1992) Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in seafood by liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, **75** (5) 872-877.

PERKIN ELMER (1993) *HPLC system for PAH analysis*. The PERKIN ELMER CORPORATION, Norwalk.

PFANNHAUSER, W. (1991a) Polyzyklische aromatische kohlenwasserstoffe (PAK) in der nahrung und auf ausgewählten gemüseproben in Osterreich. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **82**, 66-79.

PFANNHAUSER, W. (1991b) Polyzyklische aromatische kohlenwasserstoffe (PAK) in der nahrung. Ein Vergleich von Literaturdaten mit einer österreichischen Untersuchung. *Ernährung*, **15**, 217-222.

PINO, J. A.; RONCAL, E. (1994) Influencia de la Temperatura de Pirolisis sobre la composición y calidad de un saborizante de humo preparado a partir de la cascarilla de arroz, *Alimentaria*, **Julio-Agosto**, 53-55.

PORTER, N. L.; RYNASKY, A. F.; CAMPBELL, E. R.; SAUNDERS, M.; SWANSON, J. T.; NIELSEN, R. B.; MURPHY, B. J. (1992) Studies of linear restrictors and analyte collection via solvent trapping after supercritical fluid extraction, *J. of Chromatogr. Sci.*, **30**, 367-373.

POTTHAST, A.; EIGNER, G. (1975) A new method for the rapid isolation of polycyclic aromatic hydrocarbons from smoked meat products. *J. Chromatogr.*, **103**, 173-176.

POTTHAST, K. (1978) Smoking methods and their effect on the content of 3, 4-benzopyrene and other constituents of smoke in smoked meat products. *Fleischwirtschaft*, **58**, 371-375.

READMAN, J. W.; TOLOSA, I.; LAW, A. T.; BARTOCCHI, J.; AZEMARD, S.; HAMILTON, T.; MEE, L.D.; WAGENER, A.; LE TISSIER, M.; DOWNING, N.; PRICE, A. R.G. (1996) Discrete bands of petroleum hydrocarbons and molecular organic markers identified within massive coral skeletons. *Mar. Pollut. Bull.*, **32** (5), 437-443.

REAL DECRETO 1138/1990, de 14 de septiembre, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para el abastecimiento y control de calidad de las aguas potables de consumo público. (BOE de 20 de septiembre, y 24 de noviembre de 1990).

REAL DECRETO 1477/1990, de 2 de noviembre, por el que se aprueba la Reglamentación Técnica Sanitaria de los aromas que se utilizan en los productos alimenticios y de los materiales de base para su producción (BOE de 22 de noviembre de 1990 y 11 de enero de 1991)

REINDL, S.; HÖFLER, F. (1994) Optimization of the parameters in supercritical fluid extraction of polynuclear aromatic hydrocarbons from soil samples. *Anal. Chem.*, **66**, 1808-1816.

SAGREDOS, A. N.; SINHA-ROY, D.; VON JAN, E. (1981) A contribution to the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked foodstuffs via caffeine complexes. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, **77** (1), 33-36.

SAINT-AUBERT, B.; COOPER, J. F.; ASTRE, C.; SPILIOTIS, J.; JOYEUX, H. (1992) Evaluation of the induction of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by cooking on two geometrically different types of barbecue. *J. Food Comp. Anal.*, **5**, 257-263.

SALGADO, M.; BOSCH, C.; SANCHEZ ROJAS, F.; CANO PAVON, J. M. (1986) Espectrofluorimetría de derivadas y sincrónica. Principios y aplicaciones. *Química Analítica* **5** (4), 374-384.

SAITO, Y.; SEKITA, H.; TAKEDA, M.; UCHIYAMA, M. (1978) Determination of benzo(a)pyrene in foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **61** (1), 129-135.

SANDELL, E.; LEVINEN, R.; KIVIRANTA, A. (1993) The content of PAH in municipal sludges from different cities in Finland. *Polycyclic Aromatic Compounds*, (**3rd supplement**), 415-425.

SANTANA, R.; SOSA, F. (1992) Sensitive simultaneous determination of benzo(a)pirene, perilene and chrysene by synchronous spectrofluorimetry in nonionic micellar media. *Talanta*, **39** (12), 1611-1617.

SHCEKATURINA, T. L.; KHESINA, A. L.; MIRONOV, O. G.; KRIVOSHEEVA, L. G. (1995) Carcinogenic polycyclic aromatic hidrocarbons in mussels from the black sea. *Mar. Pollut. Bull.*, **30**, 38-40.

SETO, H.; OHKUBO, T.; KANO, T.; KOIKE, M.; NAKAMURA, K.; KAWAHARA, Y. (1993) Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in the lung. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **24**, 498-503.

SHAW, G. R.; CONNELL, D.W. (1994). Prediction and monitoring of the carcinogenicity of polycyclic aromatic compounds (PACs). *Rev. Environ. Contam.* **135**, 1-62.

SIMAL LOZANO, J.; LAGE YUSTY, M. A.; VÁZQUEZ ODÉRIZ, L.; LÓPEZ DE ALDA-VILLAIZÁN, M. J. (1992) Mise au point d'une methode de fluorescence synchrone pour le dosage de HAP dans l'eau potable, *J. Fr. d'Hydrologie*, **23** (1), 37-55.

SIMKO, P.; SIMON, P.; KHUNOVA, V.; BRUNCKOVÁ, B.; DRDÁK, M. (1994) Kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorption from liquid smoke flavour into low density polyethylene packaging. *Food Chem.*, **50**, 65-68.

SIVASWAMY, S. N.; BALACHANDRAN, B.; BALANEHRU, S. (1991 a) South Indian foods: Contaminants and their effects. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **47** (2), 251-260.

SIVASWAMY, S. N.; NAGARAJAN, B. (1991 b) Pan fry cooking induces the formation of polycyclic aromatic hydrocarbons in meat. *Med. Sci. Res.*, **19**, 289-290.

SPEER, K.; HORSTMANN, P.; STEEG, E.; KÜHN, T.; MONTANG, A. (1990 a) Zur analytik von polycyclen in gemüseproben. *Z. Lebensm-Unters. Forch.*, **191**, 442-448.

SPEER, K.; STEEG, E.; HORTMANN, P.; KÜHN, TH.; MONTANG, A. (1990b) Determination and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in native vegetable oils, smoked fish products, mussels and oysters, and bream from the river Elbe. *J. High Resolut. Chromatogr.*, **13** (2), 104-111.

TACHIBANA, M.; KOSHIISHI, K.; FURUSAWA, M. (1988) Solvent effect on the simultaneous determination of Anthracene and 5H-benzo[b]carbazole by synchronous fluorescence spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, **215**, 347-352.

TAKATSUKI, K.; SUZUKI, S.; SATO, N.; USHIZAWA, I. (1985) Liquid chromatographic determination of PAH in fish and shellfish. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68** (5), 945-949.

TANAKA, K.; SUGAWARA, K.; MASUDA, K. (1987) Determination of benzo(a)pyrene in soil by synchronous fluorimetry. *Anal. Sci.*, **3** (1), 89-90.

TANAKA, K.; SAITO, M. (1988) High-performance liquid chromatographic separation and synchronous fluorimetric determination of PAHs in soils. *Analyst*, **113** (3), 509-10.

TANG, P. H.; HO, J. S.; EICHELBERGER, J. W. (1993) Determination of organic pollutants in reagent water by liquid-solid extraction followed by supercritical fluid elution. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **76** (1), 72-82.

TENA, M. T.; LUQUE DE CASTRO, M. D.; VALCARCEL, M. (1994) Systematic study of the influence of modifiers on the CO₂ supercritical extraction of PAHs in soil. *Chromatogr.*, **38** (7/8), 431-435.

THOMAS, D.; RONALD, A. (1985) Photolysis of polycyclic aromatic hydrocarbons absorbed on simulated atmospheric. *Environ. Sci. Technol.*, **19**, 1004-1006.

TILGNER, D.J (1968) Carcinogens in food. *Food Manufact.*, 37-42.

TILGNER, D.J (1969) Polycyclic aromatic hydrocarbons (polynuclears) in smoked foods. *Res. Rev.*, **27**, 19-41.

TOTH, L. (1971) Polycyclische kohlenwasserstoffe in geräuchertem schinken und bauchspeck. *Die Fleischwirtschaft*. **7**, 1069-1971.

TOTH, L. (1972) The effect of smoking technology on the content of carcinogenic hydrocarbons in smoked meat products. *Die Fleischwirtschaft*. **9**, 1121-1124.

TOUMINEN, J. P.; PYYSALO, H.S.; SAURI, M. (1988) Cereals products as a source of polycyclic aromatic hidrocarbons. *J. Agric. Food Chem.* **36**, 118-120.

TUCKER, S. A.; ACREE, W. E.; STREET, K. W.; FETZER, J. C. (1989) Polycyclic aromatic hydrocarbon solute probes. Part III: Fluorescence emission spectra of pyrene, ovalene, benzo(g,h,i)perylene, and coronene dissolved in liquid tetrabutylammonium sulfonate salts. *Appl. Spectrosc.* **43** (1), 162-164.

TUCKER, S. E.; CRETILLA, L. E.; WARIS, R.; STREET, K. W.; ACREE, W. E.; FETZER, J. C. (1990) Polycyclic aromatic hydrocarbon solute probes. Part VI: Effect of dissolved oxygen and halogenated solvents on the emission spectra of select probe molecules. *Appl. Spectrosc.*, **44** (2), 269-273.

TUCKER, S. A.; ACREE, W. E.; CHO, B. P.; HARVEY, R. G.; FETZER, J. C. (1991) Spectroscopic properties of polycyclic aromatic hydrocarbons: Effect of solvent polarity on the fluorescence emission behavior of select fluoranthene, fluorenchrysene; indenochrysene and indenopyrene derivatives. *Appl. Spectrosc.*, **45** (10), 1699-1705.

UTHE, J.F.; MUSIAL, C.J. (1988) Intercomparative study on the determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in marine sellfish tissue. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71** (2) 363-368.

VAESSEN, H.A.M.G.; WAGSTAFFE, P. J.; LINDSEY, A.S. (1988) Reference materials for PAHs in foodstuffs: results of a preliminary intercomparison of methods in experienced laboratories. *Fresen. J. Anal Chem.*, **332**, 325-332.

VAESSEN, H.A.M.G.; WAGSTAFFE, P. J.; LINDSEY, A.S. (1990) Reference materials for PAHs in foodstuffs: II. Results of a further intercomparison of methods in experienced laboratories. *Fresen. J. Anal Chem.* **226**, 503-510.

VAESSEN, H.A.M.G.; VAN DE KAMP, C.G.; JEKEL, A.A. (1993) BCR reference materials PAHs in foods-recent developments and outlook. *Polycyclic Aromatic Compounds*, **3** (suppl), 66-75.

VASSILAROS, D. L.; STOKER, P. W.; BOOTH, G. M.; LEE, M. L. (1982 a) Capillary gas chromatographic determination of polycyclic aromatic compounds in vertebrate fish tissue *Anal Chem.*, **54**, 106-112.

VASSILAROS, D. L.; KONG, R. C.; LATER, D. W.; LEE, M. L. (1982 b) Linear retention index system for polycyclic aromatics compounds. Critical evaluation and additional indices. *J. Chromatogr.* **252**, 1-20.

VO-DINH, T. (1978) Multicomponent analysis by synchronous luminiscence spectrometry. *Anal. Chem.*, **50** (3), 396-401.

VREULS, J. J.; JONG, G. J. and BRINKMAN, A. TH. (1991) On-line coupling of Liquid Chromatography, Capillary Gas Chromatography and Mass Spectrometry for the determination and identification of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils. *Chromatogr.*, **31** (3/4), 113-118.

WARIS, R.; ACREE, W. E.; STREET, K. W. (1988) Py and BPe solvent polarity scales: Effect of temperature on pyrene and benzo(g,h,i)perylene fluorescence spectra. *Analyst.*, **113**, 1465-1467.

WARNER, J. S. (1976), Determination of aliphatic and aromatic hydrocarbons in marine organisms. *Anal. Chem.*, **48**, 578-583.

WEI-XI YAO, WEN-QI HE, XUE-HUA HU; XUE-LI CAO (1993) Rapid determination of the isomers of polycyclic aromatic hydrocarbons with three-dimensional fluorescence spectrum, *J. Mol. Struct.* **294**, 279-282.

WEINER, E. R. (1978) Equivalence of simultaneous scanning and three-dimensional plotting of fluorescence spectra. *Anal. Chem.* **50** (11), 1583-1584.

WHITE, R. H.; HOWARD, J. W.; BARNES, C. J. (1971) Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid smoke flavors. *J. Agr. Food Chem.*, 1971, **19** (1), 143-146.

WHO (World Health Organization) (1984) *Guidelines for Drinking Water Quality*. vol 2. *Health criteria and other supporting information*. Geneve.

WHO (World Health Organization) (1984) *Guidelines for drinking Water Quality*. Vol.2. *Health Criteria and Other Supporting Information*. Geneva.

WILD, S. R.; JONES, K. C. (1991) Studies on the PAH content of carrots (*Daucus Carota*) *Chemosphere*, **23** (2), 243-251.

WILD, S. R.; JONES, K. C. (1992) Polynuclear aromatic hydrocarbon uptake by carrots grown in sludge-amended soil. *J. Environ. Qual.*, **21**, 217-225.

WISE, S. A.; HILPRET, L. R.; REBBERT, R. E.; SANDER, L. C.; SCHANTZ, M. M.; CHESLER, S. N.; MAY, W. E. (1988) Standard reference materials for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Fresen. Z. Anal. Chem.*, **332**, 573-582.

WISE, S. A.; BENNER, B. A.; CHRISTENSEN, R. G.; KOSTER, B. J.; KURZ, J.; SCHANTZ, M. M.; ZELSLER, R. (1991) Preparation and analysis of a frozen mussel tissue reference material for the determination of trace organic constituents. *Environ. Sci. Technol.*, **25** (10), 1695-1703.

WISE, S. A.; SANDER, L. C.; MAY, W. E. (1993) Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **642**, 329-349.

WRIGHT, B. B.; SMITH, R. D. (1989) Capillary supercritical fluid chromatography methods. *Chemical analysis of polycyclic aromatic compounds*, Tuan Vo-Dinh (Ed.), John Wiley & Sons, Inc, 111-149.

YUCO YABICU, H.; SATOU MARTINS, M.; YAMASAKI TAKAHASHI, M., (1993), Levels of benzo[a]pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid smoke flavour and some smoked foods, *Food. Addit. Contam.*, **10** (4), 399-405.

ZHENHUA, Z.; WENYI, Q. (1989) Synchronous fluorescence technique and its use in identification of polynuclear aromatic hydrocarbons in urinr samples. *J. Environ. Sci.*, **1** (2), 109-115.

